

Entwicklung
eines monoklonalen Antikörpers
gegen Cyclosporin A

Gabriele Christina Pflanz

Disbui. München

1988



Aus dem Institut für chirurgische Forschung
der Universität München
Vorstand Prof.Dr.Dr.h.c. W.Brendel

Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers
gegen Cyclosporin A

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Gabriele Christina Pflanz

aus
München

Jahr
1987

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.Dr. B.-U. von Specht

Mitberichterstatter: Prof. Dr.Dr.h.c. W.Brendel
Prof. Dr. M.Knedel

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 11.2.1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Vorwort

Die Humanmedizin läßt sich nicht unabhängig von anderen Natur- bzw. Geisteswissenschaften betrachten. Dies trifft besonders auf das Gebiet der Immunologie zu. Biochemie und Chemie, Molekularbiologie und Genetik, Physiologie und Mikroanatomie sind nur einige Disziplinen, die mit der Immunologie eng verbunden sind. Immunologische Erkenntnisse halten Einzug in internistische, intensivmedizinische, chirurgische, gynäkologische, pädiatrische und vor allem onkologische Bereiche. Dabei ist interdisziplinäre Kooperation unabdingbar erforderlich. Für diese immunologisch-biochemische Arbeit danke ich deshalb allen, die mich unterstützt haben:

- * Herrn Prof.Dr.Dr.h.c.W.Brendel für die Möglichkeit, am Institut für chirurgische Forschung tätig sein zu können,
- * Herrn Prof.Dr.B.U.v.Specht für die Überlassung des Themas sowie Anleitung und Unterstützung über Jahre hinweg,
- * Herrn Dr.W.Mraz für radioimmunologische Untersuchungen und Beratung, vorallem zum Thema Ciclosporin,
- * Herrn M.Marget für molekularbiologische Studien,
- * Herrn R.M.Walter für die Anpassung eines EDV-Textverarbeitungssystems zur Drucklegung der Arbeit,
- * Frau U.Schwarz und Frau A.Bohlmann für labortechnische Hilfe und ausgezeichnete Zusammenarbeit.

München, im Jahre 1986

Gabriele C. Pflanz

Inhalt	Seite
Teil A: Ciclosporine, Ciclosporinspiegel und deren Bestimmung	4
Teil B: Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers gegen Cyclosporin A und dessen Einsatzmöglichkeiten	
I. Monoklonale Antikörper und ihre Bedeutung	14
II. Gewinnung polyklonaler Antisera mit Antikörpern gegen Cyclosporin A	18
1. Material und Methoden	
1.1. Präparation eines Cyclosporin C Konjugates	
1.2. Immunisierung von Kaninchen und Maus	
1.3. Messung von Antikörpertitern	
2. Ergebnisse	
3. Diskussion	
III. Zellfusion und Selektion von Hybridomen	31
1. Material und Methoden	
1.1. Milzzellpräparation von immunisierten Mäusen	
1.2. Zellkultur und Präparation von Mausemyelomzellen	
1.3. Zellfusion	
1.4. Autoradiographie	
2. Ergebnisse	
3. Diskussion	
IV. Selektion von Hybridomen mit relevanter Antikörperproduktion und Zellklonierung	48
1. Material und Methoden	
1.1. Beschichtung von Polyvinylchloridmicrotiterplatten	
1.2. Enzyme linked immunosorbent Assay zum Nachweis von Cyclosporin-Antikörpern	
1.3. Limiting dilution zur Zellklonierung	
2. Ergebnisse	
2.1. Prinzip des Nachweises von Cyclosporin-Antikörpern mittels ELISA	
2.2. Nachweis der Bindung von Cyclosporin an Polyvinylchloridplatten	
2.3. Nachweis von Cyclosporin-Antikörpern in polyklonalen Seren und Zellkulturüberständen mittels ELISA	
2.4. Verschiedene Einflüsse auf die Messung von Cyclosporin-Antikörpern mittels ELISA	
3. Diskussion	
3.1. Bestimmungsmethode: ELISA	
3.2. Zellkulturmethoden	
V. Antikörpergroßproduktion und Antikörperanreicherung	74
1. Material und Methoden	
1.1. in vitro und in vivo Produktion	
1.2. Anreicherung durch Ammoniumsulfatfällung	
1.3. Anreicherung durch Affinitätschromatographie	
2. Ergebnisse	
2.1. Nachweis von Cyclosporin-Antikörpern in Ascites	
2.2. Nachweis von Cyclosporin-Antikörpern nach Anreicherungsverfahren	
3. Diskussion	

VI. Antikörpercharakterisierung	89
1. Material und Methoden	
1.1. Ouchterlony-Immundiffusion	
1.2. Immunelektrophorese	
1.3. Subklassen-ELISA	
2. Ergebnisse und Diskussion	
VII. Einsatzmöglichkeiten für monoklonale Ciclosporin-Antikörper	98
1. Material und Methoden	
1.1. Beschichtung von Polystyrolplatten mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen Ciclosporin	
1.2. Double-Sandwich-ELISA	
1.3. Radioassay	
2. Ergebnisse	
3. Diskussion	
Teil C: Zusammenfassung	111
Teil D: Verzeichnisse	
I. Verzeichnis der Abkürzungen	115
II. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Tafeln	116
III. Literaturverzeichnis	118
1. alphabetisches Literaturverzeichnis	
2. themenorientiertes Literaturverzeichnis	
Appendix	125
1. Nomenklatur	
2. Anmerkungen zu statistischen Methoden	
3. Tierhaltung	

Teil A:

Ciclosporine, Ciclosporinspiegel und deren Bestimmung



Als Anfang der siebziger Jahre aus Erdproben der Hardanger Vidda, einer Hochebene im Süden Norwegens, der Pilz *Tolypocladium inflatum* Gams isoliert werden konnte, hoffte man auf die Gewinnung neuer antibiotisch wirksamer Substanzen, weil das Pilzmycel ein antibiotikahaltiges Gemisch enthielt. Hauptbestandteil der Pilzextraktion ist Cyclosporin A (CsA; zur Nomenklatur vgl. Appendix). Die gesetzten Erwartungen erfüllte CsA nicht, dafür aber war die Entdeckung der immunsuppressiven Eigenschaften von CsA ein weit wichtigerer Schritt für die Medizin (Tab.1). Gelang es doch mittels CsA die Erfolge der Transplantationsmedizin hinsichtlich Organerhaltung und Patientenüberlebensdauer deutlich zu verbessern, so daß heute Nierentransplantationen zur Routine geworden sind und die Erfolgsquote unter CsA-Medikation um durchschnittlich 10% gesteigert werden konnte (98,99). Bei CsA handelt es sich um ein neutrales, cyclisches Undecapeptid. Dieses Oligopeptid aus 11 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 1202,6 und der Summenformel $C_{62}H_{111}N_{11}O_{12}$ ist außerordentlich hydrophob (Abb.1). 10 dieser 11 Aminosäuren konnten leicht identifiziert werden. Die elfte, die sich in Position 1 befindet, war bisher unbekannt. Durch Röntgenstrukturanalyse und Kernresonanzspektroskopie konnte schließlich auch ihr Aufbau geklärt werden. Es handelt sich um (4R)-4-[(E)-2-butenyl]-4,N-dimethyl-L-threonin (MeBmt). MeBmt ist neben α -Aminobuttersäure in Position 2 und Methylvalin in Position 11 für die immunsuppressive Eigenschaft verantwortlich (67,113,114,115, 119). Diese jüngst gewonnenen Erkenntnisse lassen auf neue,

ENTWICKLUNG VON CICLOSPORIN

1970	Thiele:	Entdeckung antimykotisch wirkender Substanzen in Fungi imperfecti
	Kis et al.:	Isolierung und Charakterisierung der Metaboliten als neutrale Polypeptide
1971	Baerri/Rüegger:	Teilweise Reinigung der Metaboliten für die Einleitung eines biologischen Screenings
1972	Borel:	Entdeckung immunsuppressiver Eigenschaften der Metaboliten bei Nagetieren
1973	Rüegger:	Reinigung von Ciclosporin
	Dreyfuss et al.:	Kultivierung der Pilzstämme und Herstellung von Ciclosporin
1974	Borel et al.:	In vivo und in vitro Immunsuppressionsversuche bei Tieren
1975	Petcher et al.:	Strukturaufklärung von Ciclosporin
	Rüegger:	Strukturaufklärung von Ciclosporin
1976		Toxizitätsstudien
		Immunsuppressive Wirkung in Transplantationsstudien weltweit bestätigt
1978	Calne et al.:	Klinische Ergebnisse bei Nierentransplantationen
	Powles et al.:	Klinische Ergebnisse bei Nierentransplantationen
1980	Wenger:	Totalsynthese von Ciclosporin
1983		Registrierung und Zulassung von Ciclosporin

Tabelle 1: Entwicklung von Ciclosporin
(modifiziert nach E.Wiscott, 1982)

biosynthetisch hergestellte CsA-Analoga hoffen (42). CsA als lipophile Substanz wird fast ausschließlich über das Cytochrom P450 abhängige, mikrosomale Transformationssystem der Leber mittels N-Demethylierung und Hydroxylierung metabolisiert. Nur weniger als 1% der ursprünglichen Substanz und etwa 5% der Metaboliten werden renal eliminiert. Ein enterohepatischer Kreislauf konnte für die 9 bisher näher bekannten Abbauprodukte nicht nachgewiesen werden. Als Metaboliten erster Ordnung müssen beim Menschen die Hydroxymetaboliten OL-17 und 1, sowie das N-methylierte Derivat 21 angesehen werden. Diese drei und die Metaboliten der zweiten Ordnung Metabolit 8 und 18 kommen bei der Verstoffwechslung von CsA hauptsächlich vor. Es scheint so zu sein, daß die

weniger biologisch wirksamen Metaboliten auch für Nebenwirkungen nicht entsprechend verantwortlich gemacht werden können. Der gesamte Metabolismus ist noch nicht geklärt (71,122,123). Unvollständig ist auch das Wissen über einen CsA-spezifischen Rezeptor, insbesondere an den T-Lymphozyten. Die Stelle an den T-Zellen, an die sich Mitogene wie PHA, Concanavalin A oder Okt3-Antikörper binden, scheint der CsA-Bindungsregion zu entsprechen (89). Eindeutig ist die Frage nach dem Rezeptor noch nicht beantwortet. BOREL z.B. sieht eine Bindung an einen oberflächlichen CsA Rezeptor als sehr fraglich an (9). Wahrscheinlich wird CsA im Cytosol in ähnlicher Weise wie die Steroide an eine

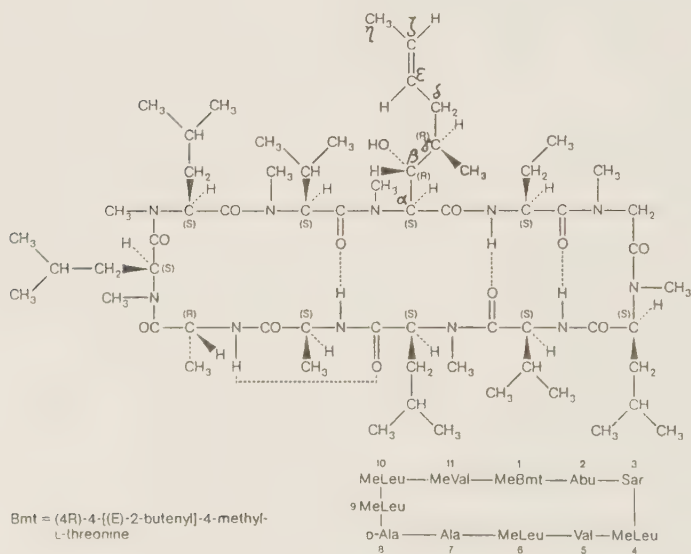


Abbildung 1:
Struktur von Ciclosporin



Abbildung 2:

Fachliteratur zum Thema Ciclosporine (nach Deutsches Institut für medizinische Dokumentation, Köln, 1986)

Cyclophilin genannte Substanz gebunden, von wo aus es die Transkription der RNA für Lymphokine (Interleukine) hemmt (13,84,86,117).

Die Bindung von CsA an Lymphozyten ist sättigbar, zeitabhängig und reversibel (11,15). Durch die Fähigkeit, selektiv die zelluläre und dosisabhängig reversibel die humorale Abwehr zu unterdrücken, bewirkt CsA als erstes Medikament eine Immunmodulation, ohne die Myelopoese stark zu beeinflussen (19,110). Die fehlende Aktivität gegen Phagozyten (Granulozyten, Makrophagen) sowie Knochenmarkstammzellen unterscheidet CsA von den Immunsuppressiva der ersten Generation (Azathioprin, Steroide, Antilymphozytenserum etc.). Durch die Hemmung der Interleukin-2-Freisetzung (= T-cell growth factor, TCGF) erfolgt ein früher Eingriff in die antigenbedingte Zellstimulation/-proliferation (G0- oder frühe G1-Phase). Indirekt blockiert CsA auch die Inter-

leukin-1-Freisetzung (lymphocyt activating factor, LAF). Der TCGF- und LAF-Mangel macht die Reifung von potentiell reaktiven T-Zellen zu cytotoxischen Zellen unmöglich. Die seit 1976 betriebenen klinischen Studien bestätigen auch in vivo die Wirksamkeit und Effektivität von CsA und schlagen sich in der steigenden Zahl von Publikationen vor allem zu diesem Themenkreis nieder (Abb.2).

Leider erbrachten diese Studien, daß auch CsA gravierende Nachteile aufweist: Nephro-, Hepato- und Neurotoxizität (Tab.2) sind die hauptsächlichen Begleiterscheinungen, die zu Dosisreduktion oder Absetzen der Therapie zwingen (34,44,53). Akut eintretende Nebenwirkungen korrelieren im allgemeinen mit überhöhten CsA-Blut- bzw. Plasmaspiegel. Bei der sogenannten interaktiven Toxizität handelt es sich um ein Zusammentreffen von CsA-Therapie und anderen potentiell toxischen Faktoren. Additive Schädigungsmechanismen sind z.B. länger dauernde Ischämie oder organspezifisch-toxische Medikamente.

Bei langdauernder Einnahme von CsA und sich dabei entwickelnden unerwünschten Effekten kann eine Überdosierung

NEBENWIRKUNGEN VON CICLOSPORIN

bei >5% der Patienten mit Langzeittherapie (fallende Häufigkeit)

- | | |
|---------------------------|--------------------------|
| 1) Nierenfunktionsstörung | 6) Leberfunktionsstörung |
| 2) Hypertonie | 7) Gingivahyperplasie |
| 3) Infekte | 8) Übelkeit |
| 4) Hypertrichosis | 9) Parästhesien |
| 5) Tremor | 10) Cushingoid |

Tabelle 2: Nebenwirkungen von Ciclosporin
(modifiziert nach B.v.Graffenried/P.Krupp, 1985)

meist ausgeschlossen werden. Dennoch ist zur Vermeidung eines großen Anteils von Nebenwirkungen die Bestimmung der CsA-Konzentrationen elementar. Ganz besonders wichtig ist eine engmaschige Blutspiegelkontrolle, eventuell sogar CsA-Tagesprofile in den ersten Tagen nach einer Transplantation, da sich gezeigt hat, daß eine optimale Früheinstellung auch die Langzeitergebnisse verbessert (116). Da es große inter-individuelle Unterschiede bei den Gewebe- und Blutspiegeln gibt, welche von variablen Absorptionsraten (20-50%), von der Leberfunktion und anderen Faktoren (Tab.3) abhängen und es derzeit nicht möglich ist, das Reaktionsmuster eines Patienten vorauszusagen, bleibt die CsA-Messung unumgänglich, um Über-, aber auch Unterdosierungen zu vermeiden. Bei Zeit-Konzentrationskurven hat sich gezeigt, daß 12 bis 24 Stunden nach der oralen CsA-Gabe die Blutspiegel mit den Gewebespiegeln im Gleichgewicht stehen. Die zu diesem Zeitpunkt gemessenen Spiegel bezeichnet man als Trough- oder Talspiegel. Sie werden als sinnvolle Therapiekontrolle angesehen. In Vollblut bestimmte CsA-Konzentrationen unterscheiden sich etwa um den Faktor vier von Plasmaspiegeln, weil sich CsA in Blut temperaturabhängig zu ca. 35% (37°C) bzw. 50% (20°C) an Erythrozyten und ca. 60% (37°C) bzw. 45% (20°C) an Lipoproteine im Plasma bindet (57,66,87). Im Vergleich zu Meßwerten, die bei 37°C erhoben wurden, verändern sich also bei Raumtemperatur bestimmte CsA-Spiegel dahingehend, daß eine Verschiebung von CsA aus dem Plasma zu den Erythrozyten hin stattfindet, wobei Erythrozyten in ihrer Bindungsfähigkeit sättigbar, Lipoproteine jedoch nicht

sättigbar sind. Bei der Bestimmung von CsA in Blut müssen außerdem eine Vielzahl anderer Faktoren bedacht werden (1,120,124). Wichtig sind neben dem Entnahmezeitpunkt die Probenvorbereitung (vgl. Tab.4), die Entscheidung über Vollblut- oder Plasma-CsA-Bestimmung und die Methode zur CsA-Messung.

Wegen der physikalischen Einflüsse insbesondere beim Zentrifugieren des Blutes wird derzeit die Messung in Vollblut bevorzugt, obwohl auf Grund der Metabolitenverteilung die Serumbestimmung wahrscheinlich Vorzüge hätte. Entscheidend ist, ob nur die Muttersubstanz oder auch die Abbauprodukte, vor allem die Hydroxymetaboliten OL-17 und 1 sowie das N-methylierte Derivat 21 miterfaßt werden sollen.

Die beiden gängigen Methoden zur CsA-Messung sind der Radioimmunoassay (RIA) und die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatographie = HPLC). Während mit der HPLC zwischen der Muttersubstanz, die wahrscheinlich für die toxischen Nebenwirkungen verantwortlich ist, und den CsA-Derivaten unterschieden werden kann, erfaßt der RIA außer CsA auch Dihydro-CsA sowie die Metaboliten 1 und 17 (Metabolitenklassifikation vgl. 106,107). Zu einem kleinen Prozentsatz werden weiterhin die Metaboliten 8 und 21 mitbestimmt, so daß damit ein gewisser Einblick in die Metabolisierungsprozesse gegeben ist (19, Tab.4), ohne jedoch quantitativ zwischen den einzelnen Derivaten zu differenzieren. Einblick in die Abbauprozesse von CsA erweist sich z.B. bei Leber- und Herztransplantationen als wichtiger Gesichtspunkt hinsichtlich der Kontrolle von

FAKTOREN FÜR DIE INTERINDIVIDUELLE VARIABILITÄT VON CICLOSPORIN-SPIEGELN	FAKTOREN FÜR DIE VERGLEICHBARKEIT VON CSA-SPIEGELN
1) Variabilität der Absorptionsrate - Zeitpunkt der CsA-Einnahme - Art der CsA-Einnahme - Störungen der intestinalen Funktion 2) Unterschiede des CsA-Metabolismus - Störungen der Leberfunktion - Medikamenteninteraktionen - genetische Faktoren ? 3) Variabilität klinisch-chemischer Parameter - Hämatokrit - Lipoproteinkonzentration 4) Patientenalter	1) Bestimmung mittels RIA oder HPLC 2) Vollblut oder Plasmapbestimmung 3) Zeitpunkt der Probengewinnung 4) Einfluß physikalischer Faktoren auf die Probe - Lagerungstemperatur - Temperatur bei Zentrifugation 5) Einfluß chemischer Faktoren auf die Probe - Heparin/EDTA/Citrat-Blut - Art der Hämolyse 6) Medikamenteninteraktionen - CsA : Ketoconazol, Danazol - CsA : Rifampicin, Phenhydan, Barbiturate 7) interindividuelle Faktoren (siehe Tabelle 3)

Tabelle 3

Tabelle 4

(modifiziert nach K.Wonigeit, 1985)

Organfunktionen. Als sogenanntes therapeutisches Fenster, in dem sich die CsA-Spiegel bewegen sollen, werden derzeit abhängig vom Zeitpunkt nach Transplantation HPLC-Spiegel von 80-200ng/ml bzw. 150-800ng/ml Vollblut bei radioimmunologischer Messung betrachtet (121).

Steigende CsA-Spiegel bei unveränderter Dosierung sind ein äußerst empfindlicher Parameter für verminderte Stoffwechselleistungen der Zelle. Umso entscheidender ist bei der immer größer werdenden Anzahl von zu untersuchenden Proben ein zuverlässiges, einfach anwendbares, sicheres und belastungsfreies Verfahren zur CsA-Bestimmung. Diesen Anforderungen wird keine der beiden Methoden gerecht (Tab.5).

GEGENÜBERSTELLUNG DER METHODEN ZUR BESTIMMUNG VON CICLOSPORIN

1) HPLC

- nur für Einzelbestimmungen geeignet
- bedingt automatisierbar
- schwieriges Verfahren
- schwer vergleichbar, da viele Methoden beschrieben
- erhöhtes Probenvolumen

2) RIA

- Radioaktivität
- Messung von CsA und Metaboliten
- bedingt automatisierbar
- für Einzelproben langwierig

Tabelle 5

Die HPLC ist zwar für Einzelproben relativ schnell, jedoch für größere Probenserien weniger geeignet. Der Hauptnachteil beim RIA liegt neben der Kreuzreaktivität in der belastenden Radioaktivität, außerdem ist auch dieses Verfahren schwer automatisierbar. Wünschenswert wäre ein enzymgebundener Immunoassay (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA), ein Verfahren, das mittels enzymgekoppelter Antikörper (Ak) in einer Art Sandwichtechnik CsA nachweist. Üblicherweise werden für einen solchen Assay monoklonale Ak benützt, auf deren Vorzüge im folgenden Kapitel eingegangen wird.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war deshalb

- * die Herstellung eines monoklonalen Ak gegen CsA sowie
- * die Überprüfung der Einsatzmöglichkeiten für diesen mAk in einem CsA-Spiegel-Monitoring.

Teil B: Kapitel 1

Monoklonale Antikörper und ihre Bedeutung

Im Unterschied zu herkömmlich produzierten polyklonalen Ak (pAK), wie man sie seit Emil v.Behring's Versuchen mit Diphtherieserum durch Immunisierung von Tieren gewinnt, ist es mit der Technik zur Herstellung monoklonaler Antikörper (mAK) durch KÖHLER und MILSTEIN (49,50) im Jahre 1975 möglich, Ak von prädefinierbarer Spezifität, gleichbleibender Qualität und unbegrenzter Reproduzierbarkeit herzustellen. Der Hauptvorteil mAK gegenüber der inhomogenen Gruppe pAK liegt in ihren gleichbleibenden biologischen Eigenschaften (Affinität zum Antigen, Epitopangriffspunkt etc.). Mit unreinen Antigenen können aber auch reine Antikörper hergestellt werden, da definitionsgemäß der mAk nur gegen ein Antigen gerichtet ist. Die Möglichkeit der Hybridoma-Zell-Mutierung macht es möglich, in der Natur nicht vorkommende Ak zu erzeugen (111). Leider weisen auch mAK entscheidende Nachteile auf: So ist ihre Entwicklung langwierig, kostenintensiv und aufwendig (22). Durch ihre Monospezifität kann es notwendig werden, mehrere mAK zu kombinieren. In solchen Fällen kann sich ein polyklonales Antiserum dem monoklonalen als ebenbürtig erweisen. Dennoch zeigten die letzten zehn Jahre mit einer riesigen Anzahl von Veröffentlichungen (über 70000) zum Thema mAK ihren Stellenwert auf.

MAK werden jetzt in fast allen diagnostischen Bereichen der Medizin (27,28,54,61) eingesetzt und halten langsam auch Einzug in die Therapie (60). Viel verspricht man sich von der Koppelung mAK mit radioaktiven, elektromagnetischen oder toxischen Substanzen, mit Enzymen oder Fluorescein. Vor allem in der Onkologie hofft man, durch mAK als Tumormarker

ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN FÜR MAK

- | | |
|--|--|
| 1) Diagnostik <ul style="list-style-type: none"> - Blutgruppenserologie - Zelldifferenzierung - Charakterisierung von Erregern - Identifikation von Gewebe - Lokalisationsdiagnostik - Tumordiagnostik | 2) Therapie <ul style="list-style-type: none"> - drug targing - antiidiotypische Ak - Transplantationsmedizin |
| | 3) Sonstiges <ul style="list-style-type: none"> - Reinigung von Proteinen - in vitro Studien (z.B. magnetic fluid) |

Tabelle 6

bei der Erkennung und Behandlung maligner Prozesse Fortschritte machen zu können (23,39,91). Die weitaus größte Verbreitung (Tab.6) finden die mAK bisher jedoch im klinisch-chemischen Bereich (20), weil sie sich ideal als Standardreagentien eignen. Außerdem können mAK zur Charakterisierung von Zellen und ihren Fragmenten, zur Lokalisation, Klassifikation und Reinigung von Proteinen verwendet werden (59,68,92).

Bei der Bestimmung von CsA in Blut oder Serum durch den Radioimmunoassay werden pAK verwendet, welche mit einigen Metaboliten, insbesondere mit dem Hauptmetaboliten beim Menschen, dem Hydroxymetabolit OL-17 (entspricht dem Metabolit 17), kreuzreagieren. Diese Nachteile könnten mAK beseitigen helfen. Der Einsatz mAk spezifisch für CsA oder einzelne Metaboliten entweder im derzeitigen RIA oder in einem anderen Immunoassay könnte die Messung von CsA optimieren und dabei genauere Hinweise auf die jeweilige Stoffwechselsitua-

tion des Patienten liefern, so daß sich das Risiko von Nebenwirkungen reduzieren ließe.

Bevor jedoch mit der Entwicklung mAK gegen CsA begonnen werden kann, müssen exakte Kenntnisse über die

* Techniken zur Herstellung polyklonaler CsA-Antikörper und

* Methoden zum Nachweis von CsA-Antikörpern

vorliegen.

Teil B: Kapitel II

Gewinnung polyklonaler Antiseren mit Antikörpern gegen Cyclosporin

1. Material und Methoden
 - 1.1. Präparation eines Cyclosporin C-Konjugates
 - 1.1.1. Konjugation mittels ECDI
 - 1.1.2. Konjugation mittels Chlorameisensäureester
 - 1.2. Immunisierung von Kaninchen und Maus
 - 1.2.1. Immunisierung unter Verwendung von Freund'schem Adjuvans
 - 1.2.2. Immunisierung unter Verwendung von Aluminiumhydroxid
 - 1.3. Messung von Antikörpertitern
 - 1.3.1. Liquid Phase Radio Assay
 - 1.3.2. Enzyme Linked Immunosorbent Assay
2. Ergebnisse
3. Diskussion

Die Herstellung von CsA-Antikörpern jeglicher Art wird dadurch erschwert, daß sich, wie bisher angenommen wurde, wegen des geringen Molekulargewichts von CsA keine AK bilden. Erst wenn CsA als Hapten benützt und an ein Trägermolekül gekoppelt wird, entfaltet es antigene Eigenschaften. Weil CsA jedoch keine reaktive Seitenkette besitzt, an die sich ein Trägerprotein binden läßt, wird ein natürliches CsA-Analogon, das Cyclosporin C (CsC), zur Koppelung verwendet. CsC enthält statt Aminobuttersäure (Abu) L-Threonin (Thr), dessen Hydroxylrest mit Bernsteinsäureanhydrid zu einem Bernsteinsäurehalbester umgesetzt werden kann. Zwar ist die Technik der Herstellung eines CsC-Hemisuccinates bekannt (106,107), die Herstellung eines CsC-Konjugates sowie einer CsC-Konjugat-Immunisierungsemulsion von DONATSCHE et al. (19) beschrieben, jedoch sind Methoden zum Nachweis von CsA-AK bis dato nicht veröffentlicht gewesen, insbesondere gab es kein Verfahren zum Nachweis von CsA-AK in kleinsten Konzentrationen, wie sie bei der Herstellung mAk anfallen. So mußte zuerst eine Nachweismethode für CsA-AK im μ - und ng-Bereich geschaffen werden.

Die Beschreibung der unternommenen Experimente und Studien der vorliegenden Arbeit, die zur Entwicklung eines mAk gegen CsA führten (vgl. Übersicht Abb.3), beginnt mit dem Punkt:

* Gewinnung polyklonaler Antiseren mit Antikörpern gegen CsA.

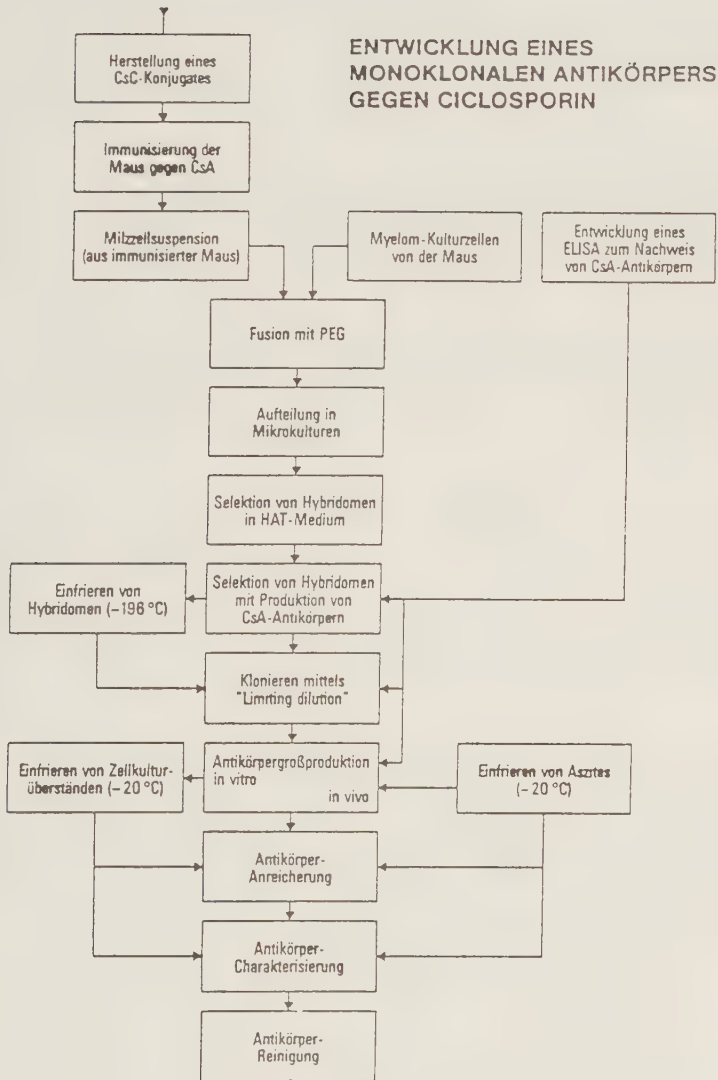


Abbildung 3

1. Material und Methoden

1.1. Präparation eines Cyclosporin C-Konjugates

1.1.1. Konjugation mittels ECDI (vgl. DONATSCHE et al.; 19)

Material:

1mg CsC-Hemisuccinat (Dr.R.Traber, Basel, Schweiz)

1ml 0,1M NaHCO₃

10mg Thyreoglobulin (Sigma, St. Louis, USA)

200mg N-ethyl-N-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid-dihydrochlorid (Merck, Darmstadt) = ECDI

1l Aqua bidest.

Dialyseschlauch Thomapor® (Reichert-Chemie, Heidelberg, Nr.94568)

Lyophilisator

Vorgehen:

Thyreoglobulin wird in Bicarbonat gelöst, dazu wird dann CsC-Hemisuccinat gegeben. Ein Drittel der Menge des ECDI wird nun portionweise zugefügt und die Mischung bei Raumtemperatur 2 Stunden (h) leicht gerührt. Nach weiteren 2h soll das zweite Drittel, schließlich das letzte Drittel zugeben werden (Gesamtzeit 6h).

Es folgt eine Dialyse gegen Aqua bidest über 16h. Anschließend wird das Konjugat lyophilisiert und bei -20°C gelagert.

1.1.2. Konjugation mittels Chlorameisensäureester

Material:

60mg Thyreoglobulin (Sigma, St. Louis, USA)

1ml gesättigte NaHCO₃, pH 8,5

12,5mg CsC-Hemisuccinat (Dr. R.Traber, Basel, Schweiz)

1ml Dioxan (Merck, Darmstadt)

3µl Triäthylamin (Merck, Darmstadt)

14,2µl Chlorameisensäureester (Merck, Darmstadt)

Vorgehen:

CsC-Hemisuccinat wird in Dioxan gelöst, danach wird Triäthylamin zugegeben und das Gemisch auf 5°C abgekühlt. Nach der Zugabe von Chlorameisensäureester wird das Gemisch 20min bei 5°C gerührt.

Währenddessen wird Thyreoglobulin in gesättigtem Bicarbonat gelöst und diese Lösung auf 5°C abgekühlt. Diese Lösung gibt man dann tropfenweise innerhalb 30min zum CsC-Gemisch. Nachdem das Gesamtgemisch bei Raumtemperatur 16h gestanden hat, wird es 16h lang gegen Aqua bidest. dialysiert und anschließend lyophilisiert. Das lyophilisierte Konjugat sollte bei -20°C gelagert werden.

1.2. Immunisierung von Kaninchen und Maus

1.2.1. Immunisierung unter Verwendung von Freund'schem Adjuvans (vgl. DONATSCHE et al.; 19)

Material:

2mg CsC-Konjugat (siehe 1.1.1.)

0,25ml 0,9% NaCl

1ml complete Freund's Adjuvans (Behring-Werke, Marburg) = CPA

1ml 2% Alugel (Serva, Heidelberg)

Vorgehen:

Aus den o.g. Reagentien wird eine Emulsion hergestellt. Davon erhält jede Balb/c-Maus (weiblich, 7-9 Wochen alt) 0,2ml intraperitoneal (i.p.). Weißen New Zealand Kaninchen werden 1ml intramuskulär

lär (i.m.) in das Hinterbein verabreicht. Dieser Vorgang wird alle 3-4 Wochen für eine Gesamtdauer von 3-4 Monate wiederholt (Näheres zur Tierhaltung: siehe Appendix).

1.2.2. Immunisierung unter Verwendung von Aluminiumhydroxid

Material:

1mg CsC-Konjugat (siehe 1.1.2.)
0,2ml $\text{Al}(\text{OH})_3$ Suspension (15g/l, Behring-Werke, Marburg)
1ml 0,9% NaCl

Vorgehen:

Das CsC-Konjugat wird in 0,2ml NaCl gelöst, das Aluminiumhydroxid in 0,8ml NaCl suspendiert. Danach wird im Verhältnis 1:1 gelöstes CsC-Konjugat und verdünntes $\text{Al}(\text{OH})_3$ vermischt. Es kann sein, daß sich nicht alle Bestandteile lösen, so daß nur eine Suspension entsteht. Jede Balb/c-Maus (weiblich, 7-9 Wochen alt) erhält 0,2ml der Suspension i.p.. Dieser Vorgang wird alle 3-4 Wochen für eine Dauer von 3-4 Monate wiederholt. (Näheres zur Tierhaltung: siehe Appendix)

1.3. Messung von Antikörpertitern

1.3.1. Liquid Phase Radio Assay

Material:

auszutestende Serumproben (Probenentnahme vgl. Appendix, Kapitel Tierhaltung)
humanes Kontrollserum (Validate[®], General Diagnostics)
Kontrollseren und -ascites für Balb/c-Mäuse
Kontrollseren für New Zealand Kaninchen
 ^3H CsA-Lsg. (Pa. Sandoz, Basel, Schweiz; 2µCi/ml)
Tris/HCL Puffer (0.05M, pH 8.5, 0,015% Tween[®] 20)
Aktivkohle pro analysi (Merck, Darmstadt)
Polystyrolröhrchen
Szintillationsröhrchen
Picofluor[®] Szintillationsflüssigkeit
Vortex-Typ Mixer
kühlbare Zentrifuge (3000UpM, 200 x g)
ß-Zähler (Model Spectral, LKB-Wallac, Turku, Finnland)

Vorgehen:

Die ^3H CsA-Lsg. wird im Verhältnis 1:4 mit Puffer vorverdünnt. Mit dem gleichen Puffer werden verschiedene Probenverdünnungen (1:1 bis maximal 1:200 für polyklonale Serumproben, 1:1 bis 1:8 für monoklonale Proben) angefertigt. In jedes Probenröhrchen werden 700µl Puffer vorgelegt, dann jeweils 100µl der verdünnten Probe und 100µl (5nCi) der ^3H CsA-Lsg. (1/1/8 vorverdünnte CsA-Lsg./Validate/Puffer) zugegeben und 2h bei 25°C incubiert. Diese Probengewische werden dann innerhalb 15min auf 4°C abgekühlt. Anschließend werden 500µl Aktivkohle zugegeben. Die Röhrchen werden gevortext und weitere 12min bei 4°C stehen gelassen. In einer gekühlten Zentrifuge (4°C) werden die Proben 5min bei 3000UpM zentrifugiert. Es werden Aliquots von 1ml überstand entnommen und in 10ml Szintillationslösung enthaltende Zählröhrchen pipettiert. Nach guter Durchmischung erfolgt die Messung im ß-Zähler (10min/Probe).

1.3.2. Enzyme linked Immunosorbent Assay siehe IV.1.2.

2. Ergebnisse

Zur Gewinnung pAK gegen CsA wurde ein Proteinkonjugat aus CsC-Hemisuccinat, welches uns Herr Dr. R.Traber (Sandoz, Basel, Schweiz) freundlicherweise überließ, und Thyreoglobulin nach der Methode von DONATSCH (19) hergestellt. Balb/c-Mäuse (weiblich, 7-9 Wochen alt) wurden über einen Zeitraum von 18 Wochen in einem Intervall von je 3 Wochen immunisiert. Die Serum-AK-Titer wurden mittels [^3H]CsA in einem Radioassay (RA) bestimmt (Abb.4). Die Messung, welche nach drei- bzw. sechsmaliger Immunisierung erfolgte, beruht auf der Fähigkeit der AK, Tritium markiertes CsA zu binden, wobei die Reaktion



durch [^3H]CsA-Überschuß nach rechts verschoben wird. Unge-

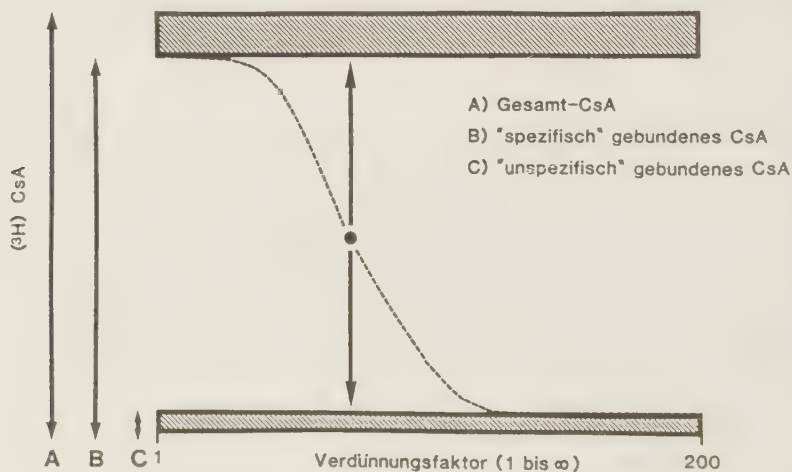
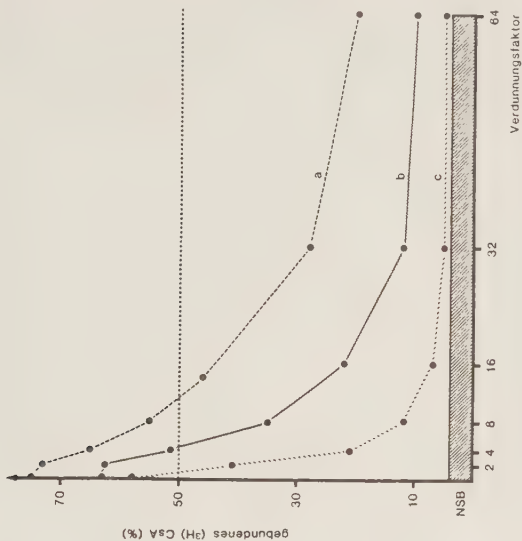


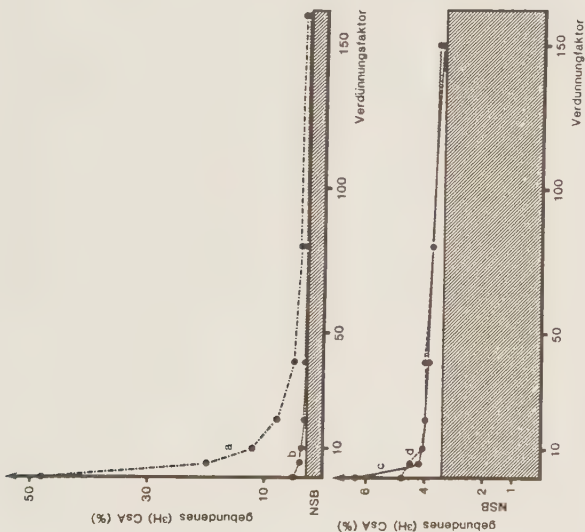
Abbildung 4:
Prinzip der Methode zum Nachweis von CsA-Ak mit [^3H]CsA (Radioassay)

NSB = nicht spezifische Bindung



- a) Serum der Maus nach 4-maliger Immunisierung (Methode 2)
 b) Serum der Maus nach 3-maliger Immunisierung (Methode 2)
 c) Serum vom Schaf (Positivkontrolle, Fa. Sandoz)

NSB = nicht spezifische Bindung



- a) Serum vom Schaf (Positivkontrolle, Fa. Sandoz)
 b) Serum der Maus nach 3-maliger Immunisierung (Methode 1)
 c) Serum der Maus nach 6-maliger Immunisierung (Methode 1)
 d) Serum der Maus nach Immunisierung mit Thyreoglobulin (Negativkontrolle)

NSB = nicht spezifische Bindung

Abbildung 5 (unten), Abbildung 6 (oben):
 Nachweis spezifischer Antikörper gegen CsA bei der Maus
 mittels Radioassay:

Abb.5: Präparation eines CsC-Konjugates mittels Ethylcarbodiimid, Immunisierung unter Verwendung von Freund'schem Adjuvans (Methode 1);

Abb.6: Präparation eines CsC-Konjugates mit gemischter Anhydridmethode, Immunisierung unter Verwendung von Aluminiumhydroxid (Methode 2).

bundenes [^3H]CsA läßt sich mit Aktivkohle ausfällen, so daß der Grad der verbleibenden Aktivität im Überstand ein Maß für die AK-Konzentration darstellt. Methodenabhängig müssen bei diesem Liquid Phase Radio Assay (RA) ca. 3-5% der Bindung als unspezifisch betrachtet werden, da sie der Ausfällung entgehen.

Es zeigte sich, daß mit so hergestelltem CsC-Hemisuccinat-Konjugat immunisierte Balb/c-Mäuse auch nach sechsmonatiger Immunisierungszeit nur geringe Konzentrationen von CsA-AK bildeten, denn die Quote an gebundenem, radioaktiv markiertem CsA betrug kaum mehr als 7% (Abb.5, Methode 1). Weiterhin unterschieden sich diese Seren kaum von Mäuseseren, welche nur mit dem Konjugatprotein (Thyreoglobulin) unter denselben Bedingungen immunisiert wurden (Negativkontrolle). Bei der Bestimmung der Titer diente ein CsA-AK enthaltendes Schafserum aus dem RIA-Kit der Firma Sandoz (Basel, Schweiz) als Positivkontrolle. Aus den vorliegenden Ergebnissen wurde der Schluß gezogen, daß die Herstellung eines CsC-Konjugates nach obiger Methode nicht effizient genug zu sein scheint, um hochtitrige CsA-AK-haltige Seren herzustellen.

Ausgehend von der Überlegung, daß Substanzen mit kleinem Molekulargewicht, wie zum Beispiel Steroide, zur Erzeugung von Steroid-Ak ebenfalls konjugiert werden müssen und sich dort die Verwendung der gemischten Anhydridmethode für die Konjugatherstellung als erfolgreich erwies (101), erstellten wir ein Verfahren zur Peptidcarrierkopplung an CsC-Hemisuccinat. Unter Einsatz der gemischten Anhydridmethode und unter Verwendung von Aluminiumhydroxid statt Alugel und

komplettem Freund'schem Adjuvans zur Immunisierung wurden Balb/c-Mäuse bei sonst gleichen Bedingungen immunisiert. Nach 9 bzw. 12 Wochen wurden wiederum die Titer bestimmt. Für Balb/c-Mäuse konnten nach 4maliger, aber auch schon nach 3-maliger Immunisierung im RIA signifikante AK-Titer gemessen werden. Die Abhängigkeit der Verdünnung der Serumprobe und meßbarer [^3H]CsA-Bindungsquote zeigt Abbildung 6. Zur Erzielung einer definierten 50%igen Bindung konnten die jetzigen Mäuseseren im Vergleich zur Positivkontrolle ca. 10 Mal stärker verdünnt werden. Auch bei einem Verdünnungsfaktor von 64, bei dem in der Positivkontrolle keine CsA-Ak mehr nachgewiesen werden konnten, ließen sich in diesen Proben deutlich über dem Background (= NSB) liegende Bindungsquoten feststellen.

Noch höhere Ak-Titer waren bei weißen New Zealand Kaninchen erzielbar. Methodenabhängig können im Radioassay maximal 90 bis 95 % des eingesetzten radioaktiven CsA gebunden werden. Sofern eine vollständige CsA-Bindung vorliegt, kann in diesem Bereich keine adäquate Konzentrationsbestimmung erfolgen. Durch entsprechende Verdünnungsreihen läßt sich jedoch eine solche Probe austitrieren (Abb.7). Diese hochtitrigen Antiseren sind zur Erreichung einer 50%igen Bindungsquote mehr als 40-fach verdünnbar und liegen überdies auch bei einem Verdünnungsfaktor von annähernd 200 noch außerhalb der unspezifisch bindenden Zone (NSB).

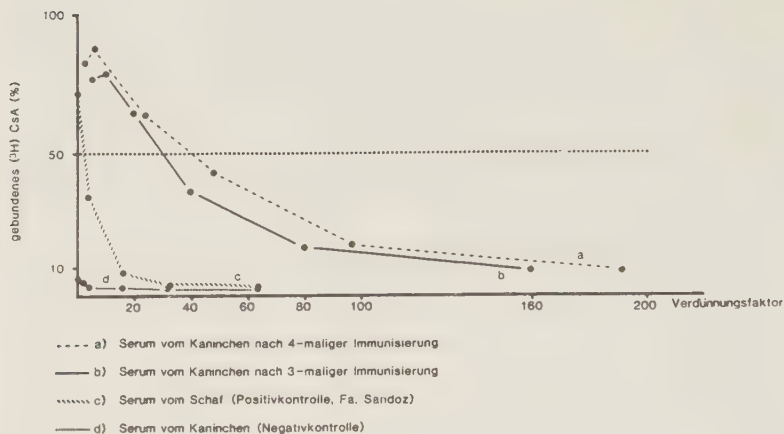


Abbildung 7:
Nachweis spezifischer Antikörper gegen CsA beim Kaninchen
mittels Radioassay:

Präparation eines CsC-Konjugates mit der gemischten Anhydridmethode, Immunisierung unter Verwendung von Aluminiumhydroxid (Methode 2).

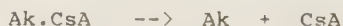
3. Diskussion

Hapten-Protein-Konjugate werden zur Herstellung von spezifischen Ak gegen ein Hapten präpariert. Dabei gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten: Zur Kopplung von Peptiden oder Nukleotiden werden häufig Carbodiimide und Diisozyanate eingesetzt. Dabei wird an Proteine wie Albumin, Polylysin oder γ -Globulin gekoppelt (31). Die Auswahl der großmolekularen Trägersubstanz ist insofern wichtig, da einige stark immunogen wirken (Albumin, Thyroglobulin), während andere sogar eine immunologische Toleranz induzieren können (Polyacrylsäure, Polyvinylpyrrolidon; 97).

Wie sich zeigen ließ, gelang mit der gemischten Anhydridmethode eine effiziente Proteincarriertkopplung von Thyroglobulin an CsC-Hemisuccinat und durch Immunisierung mit diesem Konjugat die Herstellung hochtitriger Antisera. Daß dies mit dem von DONATSCH beschriebenen Verfahren (19) nicht glückte, könnte mit einer niedrigen Kopplungsrate von Protein an das Hapten erklärt werden: Die Proteinkonjugation mit Ethylcarbodiimid (ECDI) als Vermittler bei nur sehr geringen CsC-Hemisuccinatausgangsmengen liefert zu wenig antigenwirksames Material. Außerdem erweist sich Aluminiumhydroxid als günstigeres Immunisierungsadjuvans, da es gegenüber den CFA-Emulsionen eine bessere Resorption des Antigens ermöglicht (112). Neuerdings wird diskutiert, ob CsA per se doch antigen wirksam sein könnte. Eine Immunisierung von Mäusen mit freiem CsA sei der Immunisierung mit Carrier-gekoppeltem CsC vorzuziehen (QUESNIAUX,83). Bislang

fehlen jedoch weitere Bestätigungen. Sollte jedoch ein solcher Weg auch beim Menschen möglich sein, so wären auch humane CsA-Ak denkbar. Darüberhinaus könnten humane CsA-Ak eine wichtige Rolle bei der Aufklärung des interindividuell sehr schwankenden CsA-Metabolismus geben. Angemerkt sei, daß in unseren Studien mit dem RA bei Langzeit-CsA-Patienten bisher keine eindeutig positiven Titer erfaßt werden konnten (n=24). Zu beachten ist, daß die Austestung mit dem RA für Proben mit einem Ak-Gehalt im ng-Bereich nicht möglich ist, da die spezifische Radioaktivität von [^3H]CsA zu niedrig ist, um eine ausreichende Nachweisempfindlichkeit zu erreichen. Ob die Verwendung von ^{125}J markiertem CsA Vorteile brächte, müßte noch ermittelt werden.

Andererseits ist anzumerken, daß keine 100%ige AK-[^3H]CsA-Bindung erreicht werden kann, da in geringem Maße immer auch folgende Reaktion abläuft:



Dennoch kann bei einer 90-95%igen Bindung ein Ak-Überschuß vorliegen, so daß sogar Bindungshemmungen eintreten können, welche sich jedoch durch Probenverdünnung beseitigen lassen. Die Verdünnung spielt auch beim Vergleich unserer Antiseren mit dem Kontrollserum (Schafserum, Fa. Sandoz) eine große Rolle. Beim Vergleich der vorliegenden Serumcharge mit unseren Antiseren müssen jedoch die letzteren als eindeutig höhertitrig angesehen werden. Leider wurden (auch auf spezielle Anfrage) von der Fa.Sandoz die Immunisierungsbedingungen, -zeit, Aufarbeitung und Verdünnung der Kontrollprobe nicht bekanntgegeben, so daß eine endgültiger Ver-

gleich nicht vorgenommen werden konnte. Andererseits können unter Verwendung der gemischten Anhydridmethode bei längerdauernder Immunisierungszeit noch höhere Titer erreicht werden, welche über Jahre hinweg (aus eigenen Erfahrungen sicher 2 Jahre) erhalten bleiben.

Teil B: Kapitel III

Zellfusion und Selektion von Hybridomen

1. Material und Methoden
 - 1.1. Milzzellpräparation von immunisierten Mäusen
 - 1.2. Zellkultur
 - 1.2.1. Zellzüchtung
 - 1.2.2. Zellzählung
 - 1.2.3. Einfrieren von Myelom-/Hybridomzellen
 - 1.2.4. Auftauen von Myelom-/Hybridomzellen
 - 1.2.5. Zellkulturmedien
 - 1.2.5.1. Myeloma-/Hybridomaerhaltungsmedium
 - 1.2.5.2. HAT-/HT-Medium
 - 1.2.5.3. Fusionsmedium
 - 1.3. Zellfusion
 - 1.4. Autoradiographie
 - 1.4.1. Heiße Phenolextraktion von RNA
 - 1.4.2. Natrium-Acetat-Fällung von Nukleinsäuren
 - 1.4.3. Radioaktive Markierung von MG-Längenstandard
 - 1.4.3.1. Kinasierung
 - 1.4.3.2. DEAE-Säule zum Abtrennen von Nukleotiden
 - 1.4.4. Glyoxalgel
 - 1.4.5. Northern Blot
 - 1.4.6. Nicktranslation
 - 1.4.7. Hybridisierung
 - 1.4.7.1. Vorhybridisierung
 - 1.4.7.2. Hybridisierung
2. Ergebnisse
3. Diskussion

Durch die gemischte Anhydridmethode konnte eine CsC-Konjugat hergestellt werden, welches bei Balb/c-Mäusen signifikante CsC- bzw. CsA-Antikörper hervorrief. In diesen immunisierten Tieren befinden sich also Lymphozyten, die die Eigenschaft der CsA-Ak-Produktion besitzen. Ein entsprechender Pool dieser Zellen läßt sich auch in der Milz finden (56). Da sich Lymphozyten in Zellkultur nicht länger als 14 Tage züchten lassen, können mit Milzzellsuspensionen oder aufbereiteten Lymphozytenkulturen keine entscheidenden Mengen der gewünschten Ak produziert werden. Der geniale Zug, die genetische Information zur Herstellung des relevanten Ak in eine Tumorzelle einzuschleusen, brachte die Möglichkeit, in vitro größere Mengen von Ak zu erzeugen, wobei die fabrizierende Tumorzelle in ihrem Wachstum quasi nicht limitiert ist. Der erste Schritt zur Herstellung mAK stellt die Schaffung kompetenter Lymphozyten dar (Immunisierung), es folgt die Fusion von Kernen der Myelomtumorzelle und des Lymphozyten. In einem dritten Schritt sollen die fusionierten von nicht fusionierten Zellen separiert werden (81).

In diesem Kapitel werden Material, Methoden und Ergebnisse der beiden letzten Schritte dargelegt.

1. Material und Methoden

1.1. Milzzellpräparation von immunisierten und normalen Mäusen

Material:

50ml Hank'sche Lösung (Calcium-Phosphat gesättigt)

Hautdesinfiziens

Äther pro narcoti (Boehringer, Frankfurt/M.)

sterile Pipetten, Röhrchen und Petrischalen (Greiner, Würtingen)

sterile Scheren und Pinzetten

Vorgehen:

Die immunisierte Balb/c-Maus wird 3 Tage nach der letzten Boosterung mit Äther narkotisiert. Dann wird unter dem Laminarflow die Milz steril entnommen (ein Instrumentenset für den Hautschnitt, das zweite für intraabdominell). Die Milz wird mit 37°C warmer Hank'scher Lösung abgespült. Danach werden in einer Petrischale die Milzzellen aus der Milzkapsel herausgestrichen und die geleerten Kapselteile entfernt.

Diese Milzzellsuspension zentrifugiert man (1200 UpM, 200 x g ohne Bremse) 10min und gießt den Überstand ab. Die Zellen werden vorsichtig vom Boden aufgerüttelt, wiederum mit Hank'scher Lsg. aufgeschwemmt und der Waschvorgang wie beschrieben wiederholt. Danach nimmt man die Zellen in einer definierten Menge (z.B. 10ml) Hank'scher Lsg. auf und bestimmt die Zellenzahl (siehe 1.2.1.).

1.2. Zellkultur

1.2.1. Zellzüchtung

Material:

sterile Röhrchen

sterile Zellkulturplatten mit unterschiedlich großen Vertiefungen (6/24/48/96-Loch-Platten)

sterile Zellkulturflaschen unterschiedlicher Größe (10/50/300ml)

Petrischalen

Pipetten (alle Artikel: Nunc, Wiesbaden)

luftdurchlässige Plastikfolie (Clingfilm)

Laminar Air flow (Flow Laboratories, Meckenheim)

Incubator (37°C, Wasserdampf gesättigt, 5-10% CO₂; Heraeus, München)

Anmerkung:

Die Zellen werden, um unter möglichst sterilen Kautelen zu arbeiten, entweder im Brutschrank oder bei der Bearbeitung unter dem Flow gelassen. Es empfiehlt sich, Kulturplatten immer mit luftdurchlässiger Folie zu umwickeln.

1.2.2. Zellzählung

Material:

100µl zellhaltige Mediumprobe

100µl Eosinlösung (1/10 Eosin/PBS, Eosin: Merck, Darmstadt)

sterile Pipetten und Röhrchen (Nunc, Wiesbaden)

Neubauer Zählkammer (0,100mm Tiefe, 0,00025mm²)

Mikroskop (Carl Zeiss)

Vorgehen:

Das zellhaltige Medium wird im Verhältnis 1:1 mit Eosinlsg. vermischt. Unter dem Mikroskop in der Zählkammer werden lebende = ungefärbte = grünliche bzw. tote = rote Zellen bestimmt. Zu beachten sind weiterhin die Formkriterien der Zelle. Die Vitalzellzahl errechnet sich aus:

vitale Zellen x Verdünnungsfaktor x Volumen = Zellen/µl Medium

1.2.3. Einfrieren von Myeloma/Hybridoma

Material:

zellhaltiges Material

DMEM mit 20% Clex (siehe 1.2.4.1.)

Dimethylsulfoxid (Merck, Darmstadt) = DMSO

sterile Röhrchen (1,8ml), Pipetten (Nunc, Wiesbaden)

Zentrifuge (200 x g)

Vorgehen:

Das zellhaltige Material wird 10min zentrifugiert (1200 UpM, ohne Bremse) und der Überstand abgegossen. Danach suspendiert man die Zellen in DMEM/DMSO (9/1) und stellt dabei eine Zellzahl von $1-3 \times 10^6$ Zellen/ml ein. Das Gesamtvolumen pro eingefrorene Probe soll 1-1,5ml betragen. Die Röhrchen verbleiben 24h bei -70°C und werden dann in flüssigen N_2 gegeben.

1.2.4. Auftauen von Myeloma/Hybridoma

Material:

zellhaltiges Material

DMEM (Fertigmedium mit 20% Clex, siehe 1.2.5.)

sterile Röhrchen, Zellkulturplatten, Pipetten (24-Loch, Nunc, Wiesbaden)

Vorgehen:

Das zellhaltige Material ($1-3 \times 10^6$ Zellen/ml) wird bei 37°C schnell aufgetaut und in 5ml 37°C warmes DMEM gegeben. Nach der Zentrifugation (5min, 1000UpM, ohne Bremse) wird der Überstand abgegossen, die Zellen werden vorsichtig aufgerüttelt, 5ml Medium wird zugeben und der Waschvorgang wiederholt. Die in 8ml resuspendierten Zellen werden gezählt und mit normalen Milzzellen (Präparation wie in 1.1. beschrieben) als feeder layer ausplattiert. Dabei sollte eine Konzentration von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt werden.

1.2.5. Zellkulturmedien

1.2.5.1. Myeloma-/Hybridomaerhaltungsmedium

Material:

Rohmedium:

Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM, Gibco, Heidelberg, Nr.074-2100)

3,7g/l DMEM NaHCO_3

10ml/l DMEM Non essential Aminoacids (Gibco, Nr.043-1140)

20ml/l DMEM Hepes Buffer (1M, pH 7,3; Gibco, Nr.043-5630)

Zusätze pro 800ml Rohmedium:

10ml Antibiotica/Antimycotica-Lsg. (10000 E. Penicillin/ml, 10000 µg Streptomycin/ml, 25 µg Amphoterizin B/ml; Gibco, Nr.043-5240)

10ml Vitaminlsg. (Gibco, Nr.043-1120)

10ml L-Glutamin (200mM, 29,2mg/ml; Gibco, Nr.043-5030)

10ml Na-Pyruvat (100mM; Seromed, München, Nr.0473)

160µg Gentamycin (Refobacin®)

100-200ml Petales Kälberserum (Boehringer, Mannheim) = PCS

statt PCS: 100-200ml Clex (Dextran Products Ltd., Scarborough, Kanada)

Sonstiges:

Sterilfilter (0,2µm; Gelman, Montreal, Kanada)

sterile Schraubverschlußflaschen

Sterilisator für Rohmedium und Material (Autoclav 23; Melag, Berlin)

Vorgehen:

Aus den o.g. Komponenten wird das Rohmedium hergestellt. Dieses wird (steril filtriert), in Flaschen abgefüllt und bei 4°C gelagert. Zwei Tage vor der Verwendung werden die Zusätze steril filtriert zugegeben (FCS wird vorher bei 56°C 30min inaktiviert). FCS bzw. Clex wird dabei nicht mitfiltriert). Vom Fertigmedium wird eine Probe entnommen und auf Sterilität überprüft (mindestens 24h Bebrütung bei 37°C).

1.2.5.2. HAT-/BT-Medium**Material:**

Rohmedium und Zusätze wie in 1.2.4.1. beschrieben

HAT-Lösung (13,6mg/l Hypoxanthin, 0,178mg/l Aminopterin, 3,88mg/l Thymidin; Gibco, Nr.043-1060)

BT-Lösung wie HAT-Lsg., jedoch ohne Aminopterin (Gibco, Nr.043-1065)

Vorgehen:

Es wird Fertigmedium hergestellt (wie in 1.2.5.1. beschrieben). Zusätzlich wird jedoch pro Liter Fertigmedium 5ml HAT-Lsg. bzw. BT-Lsg. beigelegt.

1.2.5.3. Fusionsmedium**Material:**

28ml Rohmedium wie in 1.2.5.1. beschrieben

20g Polyethylenglykol (PEG 1550; Serva, Heidelberg)

Autoclav

Vorgehen:

PEG (MW 1300-1600) wird 20min autoklaviert (120°C, 3bar). Man läßt die Lösung auf 50°C abkühlen, und gibt dann Rohmedium zu. Nach sorgfältigem Mischen wird die Lsg. bei RT gelagert.

1.3. Zellfusion**Material:**

Einzelzellsuspension von der immunisierten Mausmilz (siehe 1.1.)

Myelomzellen (ausgetestet wie in 1.4. beschrieben)

Fusionsmedium (PEG-Lsg., siehe 1.2.5.3.)

komplettes, aber FCS freies Medium (siehe 1.2.5.1.)

HAT-Medium (mit 20% Clex oder FCS, siehe 1.2.5.2.)

sterile Röhrchen, Pipetten, Zellkulturplatten (24-Loch, Nunc, Wiesbaden)

Zentrifuge (200 x g)

Vorgehen:

In sämtlichen Zellsuspensionen wird die Zellzahl bestimmt. Dann werden die Milzzellen der immunisierten Maus mit den Myelomzellen im Verhältnis 1:1 bis 5:1 gemischt. Bei einer Fusionsprobe sollten jedoch nicht mehr als 10^6 Milzlymphozyten eingesetzt werden. Mit FCS freiem Medium wird die Suspension auf 40ml aufgefüllt und zentrifugiert (10000rpm, ohne Bremse). Der Überstand sollte sehr sorgfältig abgesaugt werden. Danach wird das Pellet leicht aufgerüttelt. 2ml 37°C warme PEG-Lsg. wird tropfenweise innerhalb 1min zugegeben und 1min inkubiert. Nun läßt man über 5min serum-freies Medium zufließen (1ml/min). In den nächsten 5min werden jeweils 2ml Medium/min zugegeben und in den letzten 5min jeweils 3-4ml/min.

Es folgt eine erneute Zentrifugation. Der Überstand wird vorsichtig abgenommen und die Zellen in 5ml 37°C warmem HAT-Medium (mit 20% FCS oder Clex) sehr vorsichtig resuspendiert. Es werden weitere 20ml HAT-Medium zugefügt und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen werden in 24-Lochplatten ausplattiert, wobei eine Konzentration von $2-5 \times 10^4$ Zellen/ml eingestellt wird. Darüberhinaus werden, wie in 1.2.3. schon beschrieben, normale Milzzellen als feeder layer beigelegt. Nach 3-4 Tagen wird jeweils 1ml HAT-Medium/Loch dazupipettiert. Die Austestung auf AK-Produktion sollte etwa ab dem 10.-14. Tage nach der Fusion erfolgen.

1.4. Autoradiographie

1.4.1. Weiße Phenolextraktion von RNA

Material:

2 x 10⁶ Myelom-/Hybridomzellen in 600ml Medium
4ml Na-Acetat-Puffer (50mM Na-Acetat, 10mM EDTA, pH 5,0)
0,4ml 10% Sodiumdodecylsulfat = SDS
5ml Phenol
Äthanol/CO₂ (Trockeneisgemisch)
Chloropane (50/48/2 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 5 x mit 10mM Tris/1mM EDTA, pH 7,5 äquilibriert)
Zentrifuge (500 x g)
Wasserbad

Vorgehen:

Das zellhaltige Medium wird zentrifugiert (10min, 12000upM, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in Na-Acetat-Puffer suspendiert. Es werden SDS, dann auf 65°C vorgewärmtes Phenol (1:1 mit Puffer versetzt) zugegeben. Das Gemisch wird 4min im 65°C warmen Wasserbad geschüttelt und danach 1-2min in -70°C Äthanol/CO₂ abgekühlt. Es folgt eine erneute Zentrifugation (10min., 60000upM, RT). Nun wird die Phenolphase ohne Interphase von unten her abgenommen. Der Vorgang wird ab der Phenolzugabe wiederholt, dieses Mal wird jedoch die H₂O-Phase wiederum ohne Interphase abgenommen. Diese Phase wird im Verhältnis 1:1 mit Chloropane gemischt und 1min gevortext. Es schließt sich eine Na-Acetat/Äthanol-Fällung an (siehe 1.4.2.).

1.4.2. Natrium-Acetat-Fällung von Nukleinsäuren

Material:

1 Vol. wäßrige Phase der gelösten RNA
1/10 Vol. 3M Na-Acetat mit Eisessig auf pH 5,0 eingestellt
2,5 Vol. Äthanol pro analysi (Merck, Darmstadt)
70% Äthanol (Merck, Darmstadt)
Aqua bidest.
Zentrifuge (500 x g)
Vakuumentrockner

Vorgehen:

Die in Wasser gelöste RNA aus 1.4.1. wird mit 1/10 Volumen Na-Acetat-Lsg. gemischt und das 2,5-fache des Ursprungsvolumens (z.B. 5ml) an Äthanol (p.a.) dazupipettiert. Das Gemisch wird gevortext und 30min bei -20°C belassen. Durch 10 minütige Zentrifugation (10000upM, 4°C) wird die RNA präzipitiert. Der Überstand wird verworfen und auf das Pellet das Ursprungsvolumen an Äthanol (70%) gegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation unter den gleichen Bedingungen wird das Pellet im Exsikkator 10min. getrocknet und in dem gewünschten Volumen Aqua bidest. (z.B. 2ml) vorsichtig suspendiert. Die Lagerung sollte bei -70°C erfolgen.

1.4.3. Radioaktive Markierung des DNA-Molekulargewichtlängenstandards

1.4.3.1. Kinasierung

Material:

10µl [³²P]dATP (10µCi; Amersham, Braunschweig)
1,0µg Längenstandard (DNA molecular weight marker III; Böhringer, Mannheim; Nr. 528552)
1,5µl Kinasepuffer (0,5M Tris/HCl pH 7,6; 0,1M MgCl₂; 50mM DTT; 1mM Spermidin; 1mM EDTA)
Aqua bidest. ad 14,5µl
1,0µl T4-Polynukleotid-Kinase (4U/ml; Biolab's, Schwalbach/Taunus)
80µl TE-Puffer (10m TrisHCl, 1mM EDTA, pH 7,5)

Wasserbad

Vorgehen:

r-ATP, DNA und Kinasepuffer und 0,5 µl T4-Kinase werden vermischt und 20 min bei 37°C inkubiert. Nun werden nochmals 0,5 µl T4-Kinase zugegeben und wiederum 20 min bei der gleichen Temperatur inkubiert. Das Enzym wird dann bei 100°C 3 min denaturiert und der TE-Puffer zugegeben. Es folgt die Reinigung der DNA über eine DEAE-Biogel-Säule (siehe 1.4.3.2.).

1.4.3.2. DEAE-Säule zum Abtrennen von Nukleotiden

Material:

Probenmaterial (siehe 1.4.3.1.)

DEAE-Biogel A (Anion exchange gel 100-200 mesh, wet; Bio-rad, München)

7 ml 0,5 M NTE (1 ml 1 M Tris/HCl pH 7,5; 50 µl 0,2 M EDTA; 2,92 g NaCl; Aqua bidest. ad 100 ml)

5 ml 0,2 M NTE (1 ml 1 M Tris/HCl pH 7,5; 50 µl 0,2 M EDTA; 1,17 g NaCl; Aqua bidest. ad 100 ml)

Eppendorf-Röhrchen (Eppendorf, Hamburg)

Chromatographiesäule (Econo-column; Bio-Rad, München; Nr. 731-1550)

Scintillationszähler (LS 6800; Beckman, Irvine, USA)

Vorgehen:

0,2 ml Säulenmaterial werden in die Chromatographiesäule gegeben und 5 mal mit je 1 ml 0,2 M NTE gewaschen. Dann wird die Probe aufgetragen und ebenfalls 5 mal mit 0,2 M NTE gewaschen. Die Elution geschieht mit 2 ml 0,5 M NTE, wobei das Eluat in Fraktionen zu je 200 µl aufgefangen wird. In den entstandenen 10 Fraktionen sollte der erste Gipfel der Aktivität in den Röhrchen 3 bis 5 auftauchen. Aus Röhrchen 4 werden dann 50 µl (entsprechend 10000 cpm) einer Äthanol-fällung (siehe 1.4.2.) unterzogen in 10 µl Aqua bidest. aufgenommen und wie die RNA-Probe glyoxaliert (siehe 1.4.4.).

1.4.4. Glyoxal gel

Material:

10 µl (20 µg) RNA-Lösung (siehe 1.4.1 und 1.4.2.) bzw. 10 µl (25 ng) Marker-Lsg. (siehe 1.4.3.)

1,5% Agarose (Sigma, Deisenhofen) in 10 mM Na-Phosphatpuffer (1:1 Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 6,5)

50 µl Dimethylsulfoxid (Fluka, Buchs, Schweiz) = DMSO

14,5 µl Glyoxal (40% in Aqua bidest.; Kodak, Rochester; USA)

Ionenaustauscher (Anal. Grade mixed bed resin AG 501-X8(D) 20-50 mesh, fully regenerated; Bio-Rad, München)

2 µl 10% Sodiumdodecylsulfat = SDS (Serva, Heidelberg)

2 µl 0,5 M Na-Phosphatpuffer (Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 1:1)

1 µl 1% Bromphenolblau (Merck, Darmstadt)

Peristaltikpumpe (LKB, Turku, Finnland)

Elektrophoresekammer (Bio-Rad, München)

Vorgehen:

DMSO, SDS, o.g. Na-Phosphatpuffer und das vorher über den Ionenaustauscher gelaufene Glyoxal werden vermischt. Davon werden 21,8 µl abgenommen und mit 10 µl RNA-Lsg. gut gemischt. Nachdem das Gemisch 15 min bei 50°C inkubiert hat, wird Bromphenolblau zugegeben und die Probe auf das Agarosegel aufgetragen. Während der 5 stündigen Elektrophorese bei 60V (konstant) wird der Puffer ständig mit einer Pumpe umgewälzt.

1.4.5. Northern Blot

Material:

0,5 kg Gewicht

5-10 cm saugfähiges Papier

5-10 trockene Filterpapiere (3MM; Whatman, Großbritannien)

2-3 Filterpapiere (in 2x Natriumchloridsodiumcitrat = SSC getränkt; 3MM; Whatman)

Nitrocellulosefilter (NEN, Boston, USA; in 2 x SSC getränkt)

Agarosegel (siehe 1.4.4.)

3-4 Filterpapiere (mit SSC angefeuchtet; JMM; Whatman)

Schaumstoff

Wanne (bis zum ersten Filterpapier mit 20 x SSC gefüllt)

Anmerkung:

20 x SSC (175g NaCl; 88,2g Na-Citrat; ad 1l Aqua bidest.; mit NaOH auf pH7,0 eingestellt)

Vorgehen:

Die oben angegebene Reihenfolge entspricht dem Aufbau der Materialien von oben nach unten. Diese Konstruktion sollte 20h so stehen bleiben. Dann wird der Nitrocellulosefilter 2h bei 80°C im Vakuum gebacken. Es folgt die Vorhybridisierung wie in 1.4.7. beschrieben.

1.4.6. Nicktranslation

Material:

0,5µg DNA (Kc₁; Dr.O.Krawinkel, Institut für Genetik, Köln) bzw. 0,5µg DNA (t-2b; Prof.Dr.H.G.Zachau, Physiologisches Institut München)

2,0ml NT-Puffer (0,5M Tris/HCl, pH7,2; 0,1M MgSO₄; 0,1 Dithiothreitol)

1,8µl Desoxynukleotidtriphosphate (1mM; Boehringer, Mannheim) = dNTP's

1,0µl DNase (0,0001µg; Boehringer, Mannheim)

1,0µl (1µg) BSA (Fraktion V; Serva, Heidelberg)

1,4µl 0,1mM ATP (Boehringer, Mannheim)

6,0µl [α -³²P] dATP (60µCi; Amersham, Braunschweig)

2,0µl Polymerase I (10U; Boehringer, Mannheim)

4,3µl Aqua bidest.

Für die Biogel A5m Säule:

Pasteurpipette

Säulenmaterial (Biogel A5m; Bio-Rad, München)

silikonisierte Glaswolle (Serva, Heidelberg)

Tris/HCl-Puffer (10mM Tris, 1mM EDTA, pH 7,5)

Vorgehen:

Aus den angegebenen Komponenten wird eine Lösung hergestellt, welche 2h bei 15°C stehen bleibt. Es folgt zweiminütiges Erhitzen bei 100°C. Die Abtrennung der radioaktiven Nukleotide von der DNA (entweder Kc₁ oder t-2b) geschieht mit der Biogel-Ausschlußsäule.

Nach dem Erhitzen wird das Material auf die Säule aufgetragen. Die Elution wird in Portionen zu 100µl durchgeführt, wobei die Fraktionen gesammelt werden. Der erste Gipfel der biphasisch verlaufenden Aktivitätsverteilung sollte in der Fraktion 9-11 zu finden sein (ca. 20 Mio. cpm). Davon werden dann pro Hybridisierung 1 Mio. cpm eingesetzt (siehe 1.4.7.).

1.4.7. Hybridisierung

1.4.7.1. Vorhybridisierung

Material:

Nitrocellulosefilter nach dem Northern Blotting (siehe 1.4.5.)

5ml Formamid (Merck, Darmstadt; vorher über Ionenaustauscher; vgl. 1.4.4.)

2,5ml 20 x SSC (siehe 1.4.5.)

1ml 0,5M Na-Phosphatpuffer (siehe 1.4.4.)

0,3ml BPP (je 3g BSA, Picoll und Polyvinylpyrrolidon auf 100ml Aqua bidest.)

0,1ml Heringsperma-ssDNA (1µg; Boehringer, Mannheim, Nr.223646)

1,1ml Aqua bidest.

15ml-Schraubverschlußröhrchen (Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg)

Wärmeschrank mit Rollervorrichtung für Röhrchen

Vorgehen:

Aus den angegebenen Komponenten wird eine Lösung hergestellt. Der Nitrocellulosefilter wird in das Falconröhrchen gegeben und mit der Lsg. 2h bei 50°C und anschließend 1h bei 37°C inkubiert.

1.4.7.2. Hybridisierung

Material:

0,5g Dextransulfat (Merck, Darmstadt)

2,5ml Formamid (siehe 1.4.7.1.)

1,25ml 20 x SSC (siehe 1.4.5.)

0,1ml 10% Sodiundodecylsulfat (Merck, Darmstadt) = SDS

0,03ml BPP (siehe 1.4.7.1.)

0,05ml Heringaperma-ssDNA (0,5mg; Boehringer, Mannheim, Nr. 223646)

0,25ml 0,2M EDTA

0,5ml 0,5M Na-Phosphatpuffer (siehe 1.4.4.)

Waschlösungen:

2 x SSC (siehe 1.4.5.); 0,1% SDS = Lsg. A

0,1 x SSC (siehe 1.4.5.); 0,1% SDS = Lsg. B

Vorgehen:

Die Vorhybridisierungslsg. wird abgenommen und die Hybridisierungslsg. mindestens über 6h, besser über 16h, mit der radioaktiv markierten Probe, die zuvor 2min bei 100°C erhitzt wurde, bei 37°C inkubiert. Dabei sollte das Gemisch leicht bewegt werden. Bei Raumtemperatur (RT) folgt dann zweimaliges Waschen über je 10min. und anschließend bei 55°C wiederum zweimaliges Waschen über je 10min. Dazu wird Waschlsg. A verwendet. Mit Waschlsg. B schließt sich bei RT eine letzte Waschung über einmal 10min an.

2. Ergebnisse

Drei Tage nach der letzten Boosterung mit CsC-Hemisuccinat-konjugat ohne Adjuvans wurde von den immunisierten Balb/c-Mäusen unter sterilen Kautelen die Milz entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. 10^9 Milzzellen wurden mit 3×10^7 Myelomzellen der Linie X63-Ag8 (51,52,92), die uns Herr Prof.Dr.G.KÖHLER freundlicherweise zur Verfügung stellte, nach der Methode von Z.ESHAR (29) fusioniert. Mittels Autoradiogramm konnte vorher festgestellt werden, daß diese Myelomzelllinie keine eigenen Immunglobuline bzw. Anteile (leichte, schwere Ketten) mehr sezernierten. Das eingesetzte Verfahren, dessen Prinzip in Abb.8 schematisch aufgezeigt ist, beruht auf der Separation von RNA mittels heißer Phenolextraktion (18), der elektrophoretischen Auftrennung der RNA und ihrer Hybridisierung nach dem Northern Blotverfahren (70). Als Vergleichsmarker wurden entsprechende DNA-Standards autoradiografisch abgebildet. Aus Abbildung 9a und b läßt sich entnehmen, daß die 2,03 bzw. die 1,58 Kilobasenpaarbande, wo normalerweise die schwere bzw. leichte Kette ausgemacht werden kann, für die Myelomzelle nicht nachweisbar ist. Zum Vergleich ist eine AK-produzierende, fusionierte Zelle (Hybridoma) wiedergegeben. Weil die verwendete Tumorzelllinie keine Immunglobuline oder AK-Bestandteile (leichte bzw. schwere Ketten) mehr sezerniert, wird sie im folgenden als nonsecreting oder NS0(-Zelle) bezeichnet werden.

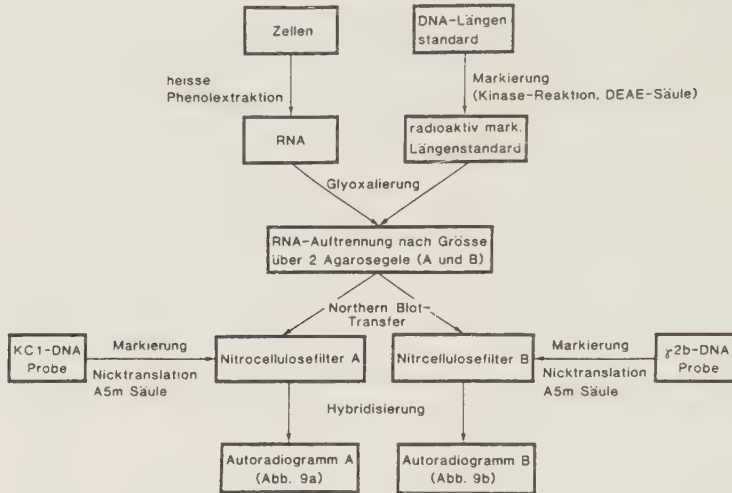
AUTORADIOGRAMM: Prinzip der Methode

Abbildung 8:

Nachweis der Sekretion von Immunglobulinen bzw. deren Bestandteilen (leichte, schwere Kette) mittels Autoradiogramm

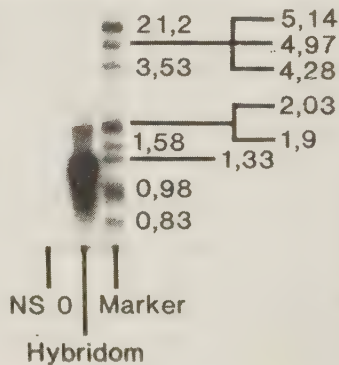
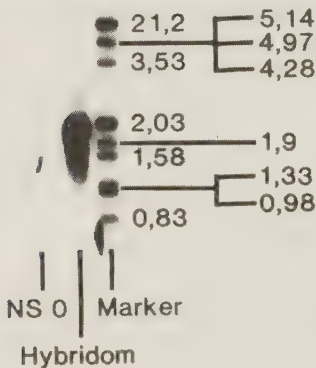


Abbildung 9a

Abbildung 9b

Autoradiogramme zum Nachweis der Sekretion von leichten und schweren Ketten

Zahlenwerte sind Angaben der betreffenden Kilobasenpaare. 2,03 Kilobasenpaar entspricht der schweren Kette, 1,58 der leichten Kette. NS0 = nonsecreting Cell.

Zur Fusion müssen sich die NSO-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase mit einer Vitalität von mindestens 95% befinden. Als ideale Wachstumsbedingungen erwiesen sich eine Einstellung der Zellkonzentration auf $0,5$ bis $1,5 \times 10^5$ Zellen/ml Nährflüssigkeit, die Verwendung von Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM) unter Zusatz von 20% foetalem Kälberserum (FCS), die Zugabe von normalen Milzzellen (10^6 Zellen/ml) als Wachstumsfaktorendonator sowie eine sorgfältige Überwachung und Prüfung auf Sterilität (vgl. 6). Wahlweise kann auch industriell hergestellter Serumersatz (Clex[®]) statt FCS verwendet werden, sofern die Zellen daran angepaßt worden sind. Dies ist vor allem deshalb zu empfehlen, weil Clex[®] einen immunglobulin- und mycoplasmenfreien Zusatz darstellt, der überdies auch nicht mehr inaktiviert werden muß. Bei entsprechender Behandlung der Zellen lag die Verdopplungszeit konzentrationsabhängig bei 15,5 ($\pm 3,5$) Stunden. Außerdem fanden sich bei der Zellzahlbestimmung mit Eosin nicht nur die geforderte Vitalität, sondern auch besonders gleichmäßig gerundete, weniger polymorphe Zellen. Derart vorbereitete Myelomzellen wurden unter Verwendung von Polyäthylenglykol als Fusionsreagenz mit den B-Lymphozyten der immunisierten Maus fusioniert (Abb.10), so daß aus zwei Heterokaryen ein Synkaryon entstand (40). Nach erfolgreicher Fusion sind in einer solchen Zellkultur: NSO-Zellen und Lymphozyten, welche nicht fusioniert wurden, NSO-NSO-Hybridomzellen, Lymphozyten-Lymphozyten-Hybridomzellen und die erwünschten NSO-Lymphozyten-Hybride (Abb.11). Da verbliebene NSO-Zellen die Kulturen innerhalb kürzester Zeit überwachsen

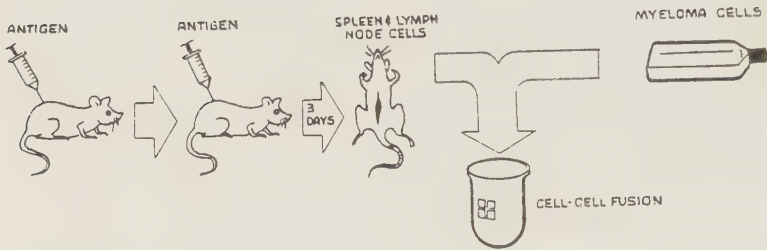


Abbildung 10:
Fusion von Myelomzellen und Lymphozyten

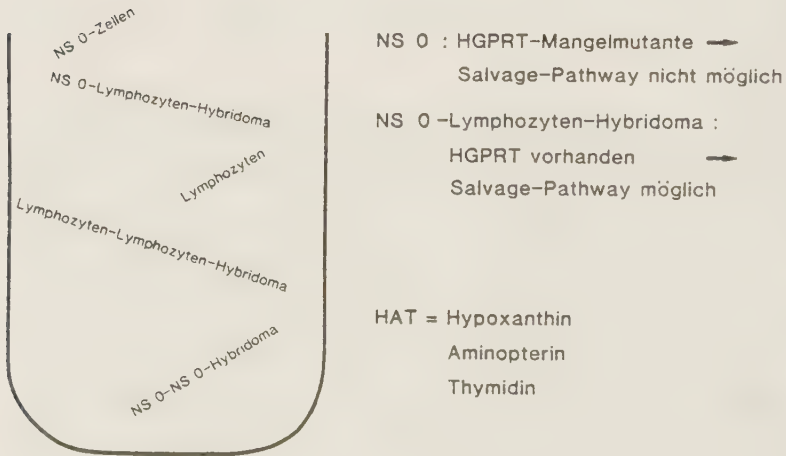


Abbildung 11:
Selektion von NS0-Lymphozyten-Hybridoma mittels HAT-Medium

hätten (ihre Verdopplungszeit ist kürzer als die der Hybride), wurde sofort nach der Fusion mit der Selektion der erwünschten Zellen unter Anwendung des LITTLEFIELD'schen Mediums begonnen (65). Dafür werden der üblichen Zellnähr-
lösung die Komponenten Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin (HAT) zugesetzt. Weil es sich bei den verwendeten NS0-Zellen

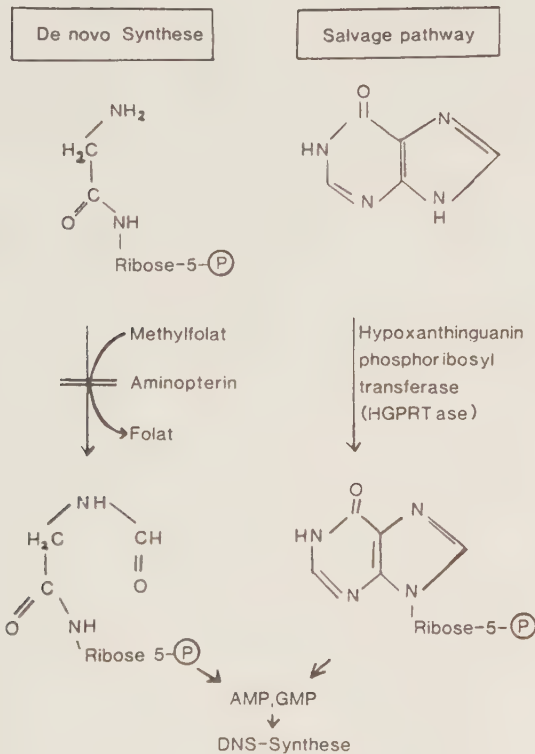


Abbildung 12:
Synthesewege der Purine

Die De novo Synthese wird durch Aminopterin blockiert, während die Synthese der DNS aus Einzelbruchstücken bei Anwesenheit von HGPRTase möglich bleibt.

überdies um Enzymmangelmutanten, welche durch 8-Azaguanin-Behandlung erzeugt wurden, handelt, sind diese bei Blockade der De novo-DNS-Synthese durch den Folsäureantagonisten Aminopterin nicht in der Lage den rettenden Ersatzweg der DNS-Synthese aus Einzelbausteinen zu betreten (Abb.12). Der Enzymmangel besteht im Fehlen der Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase (HGPRTase). Anders dagegen die Hybridzelle: Sie besitzt von Seiten der Milzzelle das Enzym HGPRTase und ist damit die einzige Zellart, welche in der Fusionskultur überlebt, wenn zusätzlich Einzelnukleotide (Hypoxanthin und Thymidin, da Aminopterin auch die Thymidinsynthese hemmt) angeboten werden.

Der Zusatz von HAT zur Nährlösung erfolgte über einen Zeitraum von 8 Wochen, dann wurde für eine Woche auf nur HT-haltiges Medium übergegangen und schließlich auch dieser Zusatz weggelassen.

3. Diskussion

Alternativ zum HAT-Selektionsmedium gibt es nur die Möglichkeit, Einzelzellsuspensionen herzustellen, aus denen dann die Hybridzellklone isoliert werden. Dies ist eine äußerst aufwendige und kaum praktikable Methode, wenn man sich vorstellt, daß die Fusionsrate unter PEG eine von 5×10^4 bis 10^6 eingesetzten Zellen beträgt. Eine Selektion mittels HAT-Zugabe hat sich deshalb als Methode der Wahl erwiesen (16). Leider kann man auf die Verwendung eines Fusionsreagens nicht verzichten, da die spontane Fusionsfrequenz (von Spermie und Eizelle sowie Megakaryozyten einmal abgesehen) im allgemeinen minimal ist. Wenn auch der Bereich, in dem PEG eine Fusion vermittelt, und derjenige, in dem es cytotoxisch wirkt, eng beieinander liegen, so ist es dennoch anderen Fusionsvermittlern wie z.B. Sendai-Viren oder Lysolecithin vorzuziehen (126).

Wir wählten das Modell einer Intraspezies-Zellfusion beim Inzuchtstamm der Balb/c-Mäuse, weil sich die entstehenden Hybridome als wesentlich stabiler als Interspezies-Hybride herausstellten und eine humane Hybridzellherstellung in diesem Fall nicht durchführbar ist (50,62). Das Ziel der Arbeit war, einen im diagnostischen Bereich einsetzbaren mAK herzustellen, wobei Faktoren der Heterologität keine entscheidende Rolle spielen sollten. Daß außerdem eine HGPRTase-Mangelmutante als Myelomzelle gewählt wurde, bietet keinerlei Nachteile gegenüber den ebenfalls verfügbaren Thymidinkinase-Mangelmutanten, da die Selektionswirksamkeit

von HAT-Mediums für beide Enzymdefekte nachgewiesen ist (5). Für alle Zellkulturarbeiten ist die Bestimmung der Zellzahl ein wichtiger Bestandteil. Verwendet wurde hierzu die Fähigkeit vitaler Zellen, Eosin auszuschließen. Leider ist diese Technik ebenso wie die Anfärbung mit Trypanblau nicht so genau wie die Verwendung von Acridinorange oder Ethidiumbromid, jedoch dafür wesentlich einfacher und ungefährlicher. Bei Anwendung dieser potentiell karzinogenen Substanzen bedarf es zusätzlicher Fluoreszenzmikroskope mit adäquaten Filtern (33).

Teil B: Kapitel IV

Selektion von Hybridomen mit relevanter Antikörperproduktion und Zellklonierung

1. Material und Methoden
 - 1.1. Beschichtung von Polyvinylchloridmicrotiterplatten
 - 1.1.1. Beschichtung mit radioaktivem Ciclosporin
 - 1.1.2. Beschichtung mit Ciclosporin
 - 1.2. Enzyme linked immunosorbent Assay
 - 1.3. Limiting dilution
2. Ergebnisse
 - 2.1. Prinzip des Nachweises von Ciclosporin-Antikörpern mittels ELISA
 - 2.2. Nachweis der Bindung von Ciclosporin an Polyvinylchloridmicrotiterplatten
 - 2.3. Nachweis von Ciclosporin-Antikörpern in polyklonalen Seren und Zellkulturüberständen mittels ELISA
 - 2.4. Verschiedene Einflüsse auf die Messung von Ciclosporin-Antikörpern
 - 2.4.1. Beschichtung von Microtiterplatten
 - 2.4.2. Zugabe von Albumin zu spezie-spezifischem Antikörper
 - 2.4.3. Puffer
3. Diskussion
 - 3.1. Bestimmungsmethode: Enzymimmunoassay
 - 3.2. Zellkulturmethoden

Nach einer erfolgreichen Fusion und anschließender Selektion der fusionierten Zellen ist es wichtig, diejenigen Hybride herauszufinden, welche die gewünschten AK produzieren. Da sich in der eingesetzten Milzzellsuspension nicht nur die relevanten Lymphozyten befinden, sondern auch eine Vielzahl von Lymphozyten mit anderweitiger Ak-Sekretion, sind bei einer Zellverschmelzung überwiegend Lymphozyten fusioniert worden, welche nicht den gesuchten Ak synthetisieren. Mit Hilfe von Radio-, Enzym- oder Fluoreszenzimmunoassays (79) lassen sich die relevanten AK ausmachen. Leider verlieren Hybride die Information zur Ak-Produktion sehr leicht, weil Synkaryen mit diploidem Chromosomensatz immer die Tendenz zum Chromosomenverlust aufweisen. Bei der Balb/c-Maus liegt die Information zur Synthese eines Ak-Moleküles auf dem Chromosom 17, wobei die Synthese des variablen Ak-Abschnittes von V-Genen und die des konstanten Ak-Teiles von C-Genen gesteuert wird. Die V- bzw. C-Gene liegen nur durch ein Intron voneinander getrennt auf dem gleichen Chromosom (75,76) und werden bei der Translation nicht mit anderen RNA-Abschnitten ausgetauscht. Dadurch ist es möglich die Synthese für einen kompletten Ak in eine Myelomtumorzelle zu transferieren. Wegen der großen Variabilität der entstehenden Fusionszellen und der gleichzeitigen Gefahr, die Immunglobulinsynthesefähigkeit zu verlieren, ist ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche Herstellung mAK die sorgfältige

* Selektion von Hybridomen mit relevanter Ak-Produktion.

Weil die These "eine Zelle - ein Antikörper" gilt, ist das Ziel, mAK herzustellen, nur zu erreichen, wenn man von einer Zellkultur mit allein einem Hybridom ausgeht. Dazu werden verschiedene Techniken

* der Zellklonierung

angewandt.

1. Material und Methoden

1.1. Beschichtung von Polyvinylchloridmicrotiterplatten

1.1.1. Beschichtung mit radioaktivem Ciclosporin

Material:

20ml Äthanol pro analysi (Merck, Darmstadt)
50 μ l [³H]CsA-Lsg. (1,92 x 10⁻² μ g/ml; 0,671 μ Ci/ μ l; Sandoz, Basel, Schweiz)
2mg CsA (in pulverisierter Form; Sandoz, Basel, Schweiz)
Tris/HCl Puffer (0,01M, pH 8,0, 0,03% Tween[®] 20; NEN, Dreieich)
0,3g bovinen Serum Albumin (RIA grade; Sigma, Deisenhofen) = BSA
1 x Phosphate buffered saline = PBS
2 flexible Polyvinylchloridmicrotiterplatten (96-Loch; Dynatech, Nürtingen)
Pipetten, Reagenzgläser, Szintillationsröhrchen
durchsichtige Klebefolie (Permace; New Brunswick, USA)
Picofluor[®] Szintillationsflüssigkeit
automatischer Microtiterplattenwascher (geeignet für radioaktives Material)
Abzug
Wärmeschrank
 β -Zähler (Model Spectral, LKB-Wallac, Turku, Finnland)

Anmerkung:

10 x PBS (80g NaCl, 2g KCl, 11,5g Na₂HPO₄, 2g KH₂PO₄, 2g Na₂S₂O₅, Aqua bidest. ad 1000ml)

Vorgehen:

Es wird eine Stammlsg. mit 200 μ g CsA/ml Äthanol angefertigt und zu 10ml dieser Lösung 25 μ l der radioaktiven CsA-Lsg. gegeben. Von dieser nunmehr radioaktiven Lsg. werden mit Äthanol verschiedene Verdünnungen zu 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 20 μ g/ml, 10 μ g/ml, 5 μ g/ml, 2,5 μ g/ml und 1,25 μ g/ml angeleert. Jeweils 8 Löcher einer Microtiterplatte werden mit derselben Verdünnung gefüllt (pro Vertiefung 100 μ l). Es werden 2 gleiche Microtiterplatten gefüllt, wobei eine Reihe ungefüllt bleibt. Der Alkohol wird im Abzug über 6h verdampft. Die Platten werden dreimal mit Waschlösung derart gewaschen (siehe 1.1.2.), daß jeweils die Hälfte der Proben einer Verdünnungsreihe nicht behandelt werden. Es empfiehlt sich zu diesem Zwecke die Plattenhälfte, welche nicht gewaschen wird, mit Folie zu verkleben. Der Puffer wird sorgfältig aspiriert und jedes nicht verklebte Loch der Microtiterplatte wird mit 100 μ l einer 1,5% BSA/PBS-Lsg. gefüllt. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37°C wird die Albuminlsg. abgesaugt und die Platte wie vorher beschrieben gewaschen. Die Platte wird zerschnitten so daß die einzelnen Probenvertiefungen im Szintillationszähler gemessen werden können. Die Quenchkorrektur wird vorgenommen.

1.1.2. Beschichtung mit Ciclosporin

Material:

Äthanol pro analysi (Merck, Darmstadt)
2mg Ciclosporin A (in pulverisierter Form; Sandoz, Basel, Schweiz) = CsA
Tris/HCl Puffer (0,01M, pH 8,0, 0,03% Tween[®] 20; NEN, Dreieich)
0,15g bovinen Serum Albumin (RIA grade; Sigma, Deisenhofen) = BSA
PBS
1 flexible Polyvinylchloridmicrotiterplatte (96-Loch; Dynatech, Nürtingen)
Pipetten, Reagenzgläser
automatischer Microtiterplattenwascher
Abzug
Wärmeschrank

Vorgehen:

Aus Äthanol und CsA wird in mehreren Verdünnungsschritten eine Lösung hergestellt, welche 2µg CsA/100µl Äthanol enthält. In jede Vertiefung der Microtiterplatte werden 100µl dieser Lsg. pipettiert und die Platte bei RT im Abzug 6h stehen gelassen. Wenn der Alkohol verdampft ist, wird die Platte mit Waschpuffer dreimal gewaschen und der Puffer sorgfältig abgesaugt. Danach wird die Platte mit einer 2% BSA/PBS-Lsg. bei 37°C 1h inkubiert. Es folgt erneutes Waschen wie beschrieben.

1.2. Enzyme linked immunosorbent Assay**Material:**

auszutestende Proben (Mäuseserum, Mäuseascites, Zellkulturüberstände)
 Kontrollseren, -ascites und -zellkulturüberstände für Balb/c-Mäuse
 Verdünnungspuffer (0,03% Tween[®] 20, Phosphate buffered saline pH 7,4)
 Waschpuffer (0,03% Tween²⁰, 10mM Hydroxymethylaminomethan, pH 8,0)
 Substratpuffer (17mM Citronensäure in 65mM Phosphat, pH 6,3)
 Schaf-P(ab')₂-anti-Maus-Immunglobulin, peroxidasekonjugiert
 4% Orthophenyldiamin
 0,3% H₂O₂ (Merck, Darmstadt)
 4,5M H₂SO₄ (Merck, Darmstadt)
 Bovines Serumalbumin (RIA grade; Sigma, Deisenhofen)
 Pipetten
 beschichtete Microtiterplatte (siehe 1.1.2.)
 Wärmeschrank
 ELISA Spektrophotometer (Filter 490nm; Automatic ELISA reader, Dynatech, Nürtingen)

Anmerkung:

Alle Reagentien, sofern nicht anders vermerkt, stammen aus dem "Monoclonal antibody screening system" der Firma NEN (Dreieich, Nr. NR1601).

Vorgehen:

Mit dem Verdünnungspuffer werden Probenverdünnungen (1:500 bis 1:10000 für Serum- und Ascitesproben) angefertigt. Zellkulturüberstände bleiben unverdünnt. Danach wird pro Microtiterplattenvertiefung 50µl der auszutestenden Probe pipettiert und die Probe auf der Platte 1h bei 37°C belassen. Es folgt dreimaliges sorgfältiges Waschen mit dem o.g. Waschpuffer. Der Waschvorgang ist in Abschnitt 1.1.2. ausführlich beschrieben. Je 50µl des in Verdünnungspuffer gelösten Anti-Maus-Immoglobulins (unter Zusatz von 1,5% BSA) wird nun zugegeben und die Platte abermals 1h bei 37°C belassen. Nachdem die Platte wiederum dreimal gewaschen worden ist, folgt die Zugabe der Substratlsg. (je 50µl einer Lsg. von 0,2% OPD, 0,015% H₂O₂ in Substratpuffer). Die Entwicklung der Farbreaktion wird durch Inkubation bei 37°C für 30min zugelassen und danach mit der Zugabe von je 50µl der o.g. Schwefelsäure gestoppt. Die spektrophotometrische Auswertung erfolgt bei 490nm. Dabei wird eine Korrektur um den Blankwert vorgenommen.

1.3. Limiting dilution**Material:**

zellhaltiges Material (Hybridome)
 Einzelzellsuspension von normalen Milzzellen (siehe III.1.1.)
 DMEM mit 15-20% FCS (oder Clex) und evtl. HAT-Zusatz
 Materialien zur Zellzahlbestimmung (siehe III.1.2.2.)
 sterile Pipetten, Röhrchen, Zellkulturplatte (96-Loch; Nunc, Wiesbaden)
 Laminar flow box

Vorgehen:

Unter sterilen Bedingungen wird die Zellzahl der Einzelzellsuspension, sowie des zellhaltigen

Materials bestimmt. Dann werden die Hybridome so ausplattiert, daß sich statistisch in 36 der 96 Vertiefungen der Kulturplatte 5 Zellen/Loch, in weiteren 36 Vertiefungen 1 Zelle/Loch und in 24 Vertiefungen 0,5 Zellen/Loch befinden. In jede Einzelkultur werden zusätzlich $0,5 - 1,0 \times 10^4$ normale Milzzellen als feeder layer zugegeben.

2. Ergebnisse

2.1. Prinzip des Nachweises von Ciclosporin-Antikörpern mittels ELISA

Nachdem die Zellfusion durchgeführt und die Selektion mit HAT-Medium über drei Wochen erfolgt ist, waren mikroskopisch etwa ab dem 6.-8. Tag sich weiter vergrößernde Zellklone inmitten von abgestorbenen NS0- und Lymphozyten sichtbar (Tafel 1). Da es sich hierbei um Hybride handeln mußte, sollte jetzt die Austestung auf Produktion von AK gegen CsA erfolgen. In den Zellkulturüberständen, in denen sich die Immunglobuline befinden, reichern sich erfahrungsgemäß die Ak in ng-Konzentrationen an (17). Zur Bestimmung, ob CsA-Ak

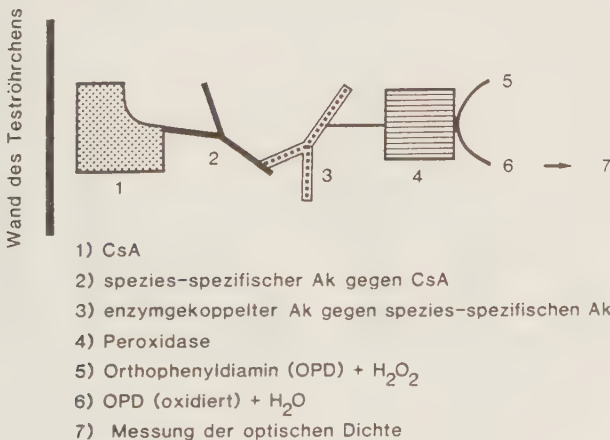


Abbildung 13:
Prinzip der Methode zum Nachweis von monoklonalen Antikörpern mittels Enzyme linked immunosorbent Assay

gebildet werden oder nicht, wurde ein enzymimmunologisches Verfahren entwickelt, bei welchem das Antigen (CsA) an eine feste Phase (Polyvinylchloridwand) gebunden wird. Wird dann die auszutestende Probe zugegeben und enthält diese Ak gegen das Antigen (Ag), so heftet sich der Ak an das Ag. Durch Zugabe eines antispezies-gerichteten Ak (Schaf-anti-Maus), welcher enzymmarkiert (Peroxidase) ist, und anschließenden Substratzusatz (Orthophenyldiamin, H_2O_2) wird eine visuell meßbare Farbreaktion erzeugt, deren Grad mit der Ak-Konzentration korreliert (Abb.13). Für die Erstellung eines solchen Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA; 24,25,26) ist es notwendig, den Nachweis zu führen, daß sich das Ag an die feste Phase bindet.

2.2. Nachweis der Bindung von Ciclosporin an Polyvinylchloridplatten

Microtiterplatten aus Polyvinylchlorid (PVC), die jeweils 96 Vertiefungen zur Probenaufnahme besitzen, wurden mit einer äthanolischen Stammlösung, welche CsA ($200\mu g/ml$)/[3H]CsA ($1,68\mu Ci/ml$) enthielt, sowie in verschiedenen Verdünnungen (bis zu $1,25\mu g/ml$) inkubiert, wobei der alkoholische Anteil verdampfte. Dannach wurde die Hälfte der Proben einem dreimaligen Waschvorgang unterzogen und mit 1,5% bovinem Serumalbumin (BSA) abgesättigt. Es schloß sich ein abermaliges Waschen an. Die einzelnen Vertiefungen wurden herausgeschnitten und auf ihre Radioaktivität überprüft. Dabei zeigte sich, daß durch diverse Behandlungsprozeduren insgesamt

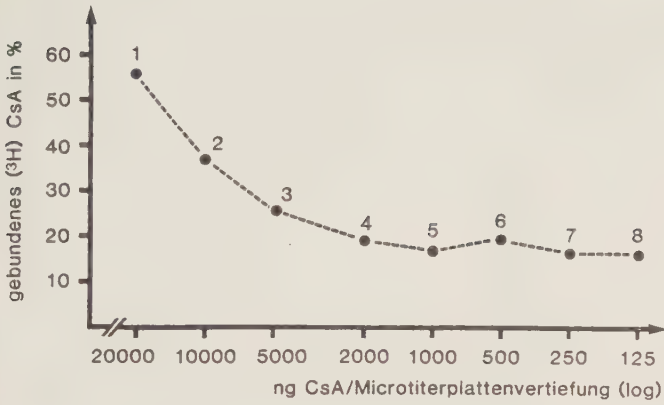


Abbildung 14 (Text siehe Abbildung 15):

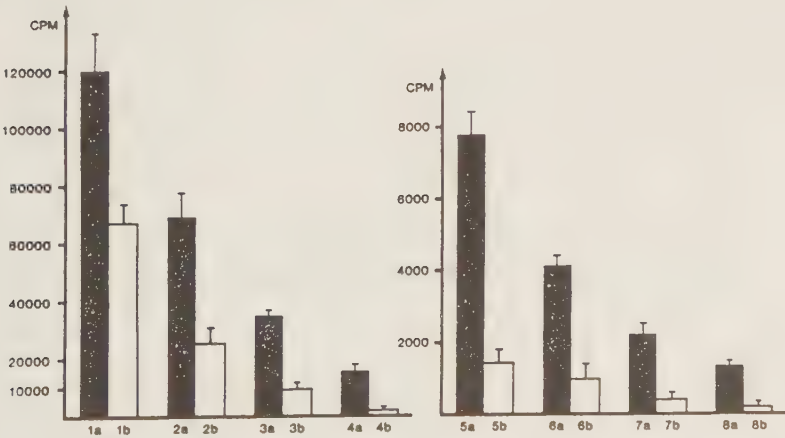


Abbildung 15:

Einfluß verschiedener Behandlungstechniken auf die Bindung von CsA/[³H]CsA an PVC-Microtiterplatten

1) Zugabe von 20000ng CsA/Microtiterplattenvertiefung; 2) 10000ng; 3) 5000ng; 4) 2000ng; 5) 1000ng; 6) 500ng; 7) 250ng; 8) 125ng; a) mit CsA/[³H]CsA beschichtete Microtiterplatte; b) wie a) und zusätzlich 3x mit Waschpuffer gewaschen, 1h mit 1,5% BSA inkubiert, nochmals 3x gewaschen; n = 8; BSA = bovines Serumalbumin; Waschpuffer = PBS mit 0,03% Tween[®] 20, 10mM Tris[®], pH 8,0;

bis zu 80% des eingesetzten [^3H]CsA wieder abgelöst wurden (Abb.14). Bei dem o.g. Verfahren wurde also eine definierte Menge von radioaktivem CsA mit verschiedenen Mengen von unmarkiertem CsA eingesetzt. Dabei konnte in einem Bereich von 0,25 - 20 μg CsA pro Plattenvertiefung über die Bestimmung der Radioaktivität eindeutig eine Bindung an die PVC-Wand belegt werden (Abb.15). Für alle weiteren Beschichtungen wurden nun, sofern nicht anders vermerkt, 2 μg unmarkiertes CsA/Vertiefung eingesetzt, da bei dieser Dosierung einerseits sichere Bindung an die PVC-Platte nachgewiesen werden konnte, andererseits in Versuchen mit CsA-haltigem Schafserum und einer Negativkontrolle diese Beschichtung sich als günstig zur Differenzierung zwischen beiden Proben erwiesen hatte.

2.3. Nachweis von Ciclosporin-Antikörpern in polyklonalen Seren und Zellkulturüberständen mittels ELISA

Mit 2 μg CsA/Vertiefung beschichtete Platten wurden mit Seren, welche im Radioassay (RA) als AK-haltig befunden wurden, nach dem ELISA-Prinzip ausgetestet und mit negativen Kontrollseren verglichen. Dabei fanden sich bei unverdünnten bzw. bis zu 1:100 verdünnten Proben keine deutlichen Unterschiede bei der Messung der optischen Dichte (OD). Wurden jedoch Verdünnungen von 1:500 bis 1:5000 hergestellt, wichen die Meßwerte der Positivkontrollen von denen der Negativkontrollen signifikant ab. Während für AK-haltige Seren in einer Verdünnung von 10^{-3} eine OD von 0,88 mit einer Stan-

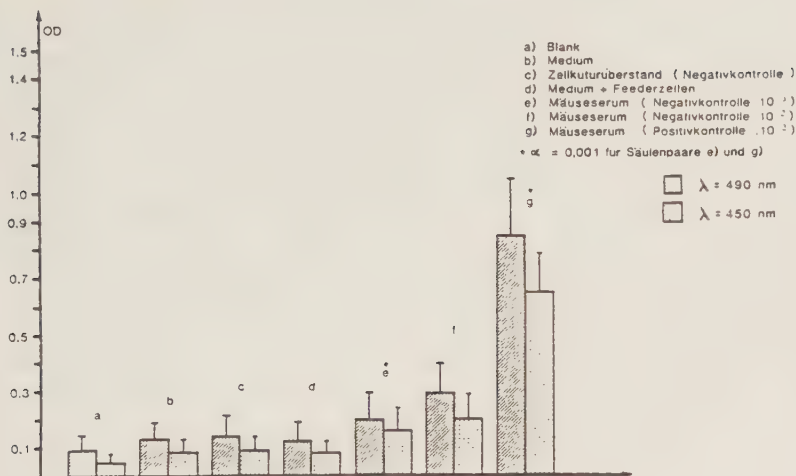
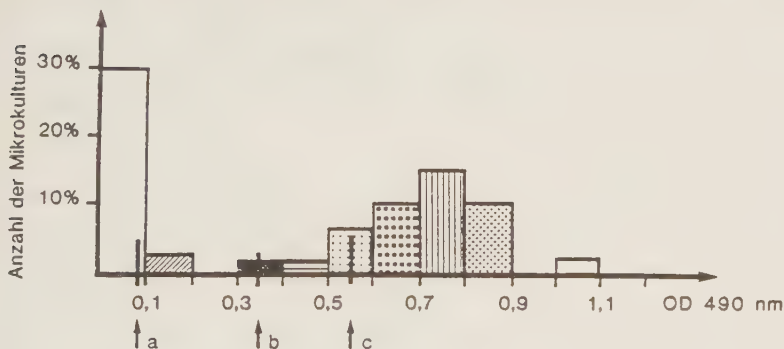


Abbildung 16:

Nachweis von Antikörpern gegen CsA mittels ELISA (Kontrollen)



a) Negativkontrolle (Mäuseserum)

b) Positivkontrolle (Mäuseserum mit Ak gegen CsA, 10^{-4} verdünnt)

c) Positivkontrolle (Mäuseserum mit Ak gegen CsA, 10^{-3} verdünnt)

n = 58

Abbildung 17:

Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA mittels ELISA

Selektion von Hybridomen mit CsA-Ak-Produktion aus Proben, welche bei der 1. Limiting dilution nach Zellfusion entnommen wurden.

dardabweichung (SD) von 0,12 gemessen wurde, lag der Vergleichswert der Negativkontrolle bei einer OD von 0,19 (SD 0,05; Abb.16). Für die weiteren Versuche wurden deshalb jeweils Positiv- und Negativkontrollseren in einer Verdünnung von 1:500 und 1:1000 mituntersucht. Ebenfalls mitgetestet wurden verschiedene Mediumproben (Rohmedium, Medium mit FCS- oder Clex[®]-Zusatz, HAT-Medium, Fertigmedium mit Feederzellen) und non-CsA-Ak-haltige Proben. Dabei ergaben sich Werte für die OD, die noch unterhalb des Vergleichswertes der Serumnegativkontrolle lagen (Abb.16).

Drei Wochen nach Fusion entnommene Zellkulturüberstände wurden unter Einbeziehung aller o.g. Kontrollproben mit dem ELISA untersucht. Bei 10% der ausgetesteten Kulturen konnten, verglichen mit der Positivserumkontrolle, ebenbürtige oder sogar höhere Extinktionswerte gemessen werden. Solche Kulturen wurden fürderhin als CsA-Ak-haltig angesehen. Auch war wiederum eine eindeutige Abgrenzung gegenüber den Negativkontrollen möglich. Das prozentuale Ergebnis und auch die Aussage, welche Kultur CsA-Ak enthielt, konnte in einem zwei Tage später ausgeführten, erneuten ELISA bestätigt werden. Mit diesem ELISA ist also eine Differenzierung zwischen CsA-Ak-haltigen und andere Ak enthaltenden Seren oder Zellkulturüberständen möglich.

Zur Klonierung der CsA-Ak-produzierenden Hybridome wurde nach dem Limiting-dilution-Prinzip Verdünnungen angelegt, die statistisch gesehen 5 Zellen/Kultur, 1 Zelle/Kultur oder 0,5 Zellen/Kultur beinhalten. Von jeder Fusionszellkultur, die im ELISA als CsA-AK-herstellend eingeordnet worden war,

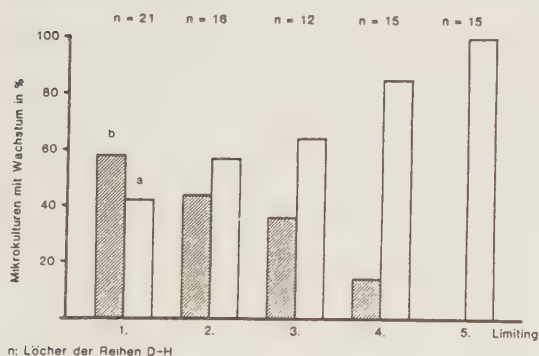
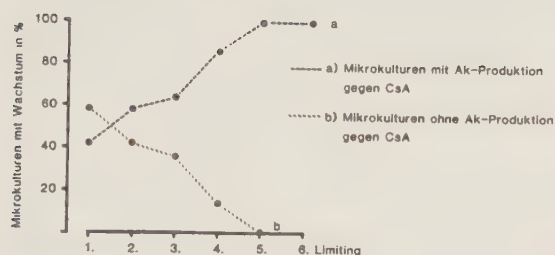


Abbildung 18:
Selektion von Hybridoma mit stabiler Produktion von CsA-Antikörpern mittels Limiting dilution für den Klon 1B3D5B5C9C11H6H12 (ELISA)

wurden einerseits Proben entnommen und eingefroren, andererseits Verdünnungsreihen angelegt, so daß aus einer Fusionszellkultur mindestens eine neue Zellkulturplatte mit 96 Einzelkulturen resultierte. Wir fertigten aus 9 Fusionszellkulturen entsprechende Limiting dilutions an. Am Tag 14 und am Tag 15 wurden aus den Einzelzellkulturen, in denen mikroskopisch Wachstum erkennbar war, je 50µl Überstand steril

abpipettiert und im ELISA ausgetestet. Das Resultat der ELISA-Bestimmung nach der ersten Limiting dilution zeigt Abbildung 17. 60% der Mikrokulturen wurden nach den o.g. Kriterien als unspezifisch produzierend eingestuft. Von den übrigen 40% wurde ein kleiner Bruchteil (3%), der besonders hohe OD-Werte (1,0 bis 1,1) ergeben hatte, zur weiteren Züchtung verwendet. Sobald diese Zellklone eine genügende Größe erreicht hatten (1×10^5 Zellen/ml), folgten erneute Klonierungen per Limiting dilution (Abb.18). Ein solcher Klonierungsschritt dauerte durchschnittlich drei bis vier Wochen. Nach 5 Limiting dilutions lagen in den Zellkulturplatten nur noch CsA-AK-produzierende Klone vor.

Tafel 2 zeigt einen Zellklon und einen vergrößerten Ausschnitt daraus, welcher 8 Tage nach Limiting dilution fotografiert wurde. In der Vergrößerung sind die Hybride deutlich als große runde Zellen erkennbar, während es sich bei den kleinen Zellen um die als feeder cells benützten normalen Lymphozyten handelt. Die nach fünffacher Limiting dilution elektierten Klone erwiesen sich als stabile Zelllinie, denn auch nach dem sechsten Klonierungsschritt (und weiteren, die in Abb. 18 nicht wiedergegeben sind) wurden 100% Mikrokulturen mit CsA-Ak-Sekretion gefunden.

2.4. Verschiedene Einflüsse auf die Messung von Ciclosporin-Antikörpern

2.4.1. Beschichtung von Microtiterplatten

Die Austestung aller Proben einschließlich der Positiv- und Negativkontrollen wurde überdies auf Microtiterplatten, deren Vorbehandlung mit Äthanol und BSA oder einzig mit BSA bestanden hatte, wiederholt. Es fanden sich unabhängig von den verschiedenen Plattenbehandlungen immer signifikante Unterschiede zwischen CsA-Ak-haltigen Proben und Vergleichskontrollen, wobei die deutlichsten Unterschiede mit einer CsA-Äthanol-BSA-Beschichtung zu erreichen waren (Tab.7). Als bedeutsamen Faktor bei der Behandlung von Microtiterplatten stellte sich die Inkubation mit Äthanol heraus. Mit Alkohol vorbehandelte Platten führten zu wesentlich größeren Differenzen zwischen Positiv- und Negativwerten. Leider ließ sich CsA in keinem wäßrigen Puffer lösen, auch eine Auflösung in Dimethylsulfoxid (DMSO) und in Polyvinylpyrrolidon war für eine Konzentration von 1mg CsA/ml Lösungsmedium nicht zufriedenstellend. In Äthanol gelöstes CsA konnte mit PBS bis zu 90% verdünnt werden, bevor eine erneute Ausflockung stattfand. Es wurden auch Versuche unternommen, bei denen die Platten mit variablem (100% bis 1%) Äthanolanteil und konstanter CsA-Menge sowie ohne CsA-Zugabe behandelt waren. Hierbei ergaben sich für einen Alkoholanteil von 10 bis 100% keine nennenswerten Unterschiede, wenn man korrespondierende Extinktionswerte derselben Proben miteinander verglich. Bei

allen Beschichtungsexperimenten erfolgte immer eine anschließende Absättigung der Platten mit 1,5% BSA in PBS, da der Einsatz von 1,5% BSA im Vergleich zu 5% oder 10% FCS in PBS gleichwertige Resultate brachte, einer Monosubstanz jedoch der Vorzug gegeben werden sollte. Weiterhin wurden Untersuchungen vorgenommen, wobei ein Teil der auszutestenden Proben und Kontrollen mit 1,5% BSA vorinkubiert worden waren, der andere Teil nicht. Der Vergleich der äquivalent

AUSTESTUNG VERSCHIEDENER BEHANDLUNGSTECHNIKEN VON POLYVINYLCHLORID-MICROTITERPLATTEN			
Probe	Behandlung mit		
	BSA 1,5%	BSA 1,5% Äthanol	BSA 1,5% Äthanol Ciclosporin
Kulturüberstand mit CsA-Ak	0,525 (0,048)	0,848 (0,068)	0,964 (0,054)
Kontroll- kulturüberstand	0,113 (0,019)	0,123 (0,019)	0,156 (0,020)
Mäuseserum mit CsA-Ak	0,254 (0,020)	0,379 (0,031)	0,511 (0,048)
Kontroll- mäuseserum	0,087 (0,008)	0,118 (0,036)	0,152 (0,026)
Ascites mit CsA-Ak	0,886 (0,066)	1,370 (0,080)	1,440 (0,059)
Kontroll- ascites	n.d.	0,198 (0,024)	0,377 (0,032)

Tabelle 7:

Einfluß verschiedener Behandlungsverfahren von PVC-Mikroti-
terplatten auf die Bestimmung von Ciclosporin-Antikörpern
Die Zahlenwerte sind Angaben über die optische Dichte und deren Standardabweichung, bestimmt mit-
tels ELISA (n.d. = nicht definiert, BSA = bovines Serumalbumin, CsA-Ak = Ciclosporin-Antikörper).

verdünnten, korrelierenden Proben erbrachte keine Unterschiede. Beschichtungsexperimente mit radioaktivem CsA auf Polystyrolplatten zeigten, daß ohne Anwendung weiterer Behandlungstechniken nur Bindungsquoten unter 5% zu erreichen waren, so daß ähnliche Versuche wie o.g. mit solchen Microtiterplatten nicht durchführbar waren.

2.4.2. Zugabe von Albumin zu spezies-spezifischem Antikörper

Mit CsA beschichtete und mit BSA abgesättigte Platten wurden in üblicher Weise mit CsA-AK-haltigen Serumproben und Zellkulturüberständen sowie Vergleichskontrollen inkubiert. In einem zweiten Schritt folgt die Zugabe eines Schaf-anti-Maus-peroxidasekonjugierten-Ak. Setzt man nun dem Puffer (PBS, 0,03% Tween[®] 20, pH 7,4), in dem der spezies-spezifische AK gelöst ist, variable Konzentrationen (0% bis 2%) BSA zu, zeigten sich, nachdem der Test in beschriebener Art und Weise zu Ende geführt worden war, besser differenzierbare Ergebnisse bei einem BSA-Zusatz zwischen 1% und 2% (Abb.19). Für weitere Testungen wurde deshalb eine Zugabe von 1,5% BSA zum enzymmarkierten Ak gewählt.

2.4.3. Puffer

Serum- und Ascitesproben, auf die ausführlich in Kapitel V eingegangen werden soll, müssen zur Bestimmung von CsA-AK vorverdünnt werden. Dazu stehen mehrere physiologische Puffervarianten zur Verfügung. Überprüft wurde der Einfluß

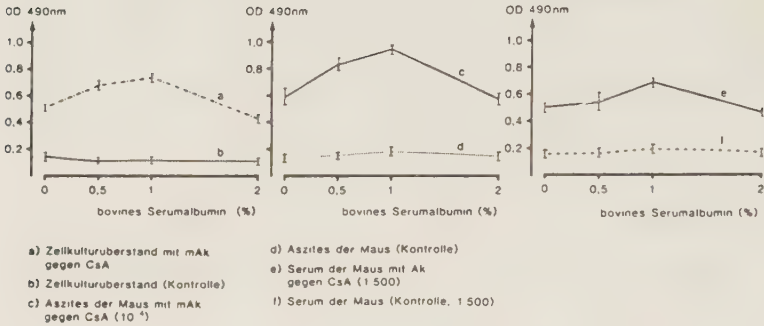


Abbildung 19:

Einfluß verschiedener Faktoren auf den Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA mittels ELISA:

Einfluß der Zugabe von Albumin zu spezifischem Antikörper

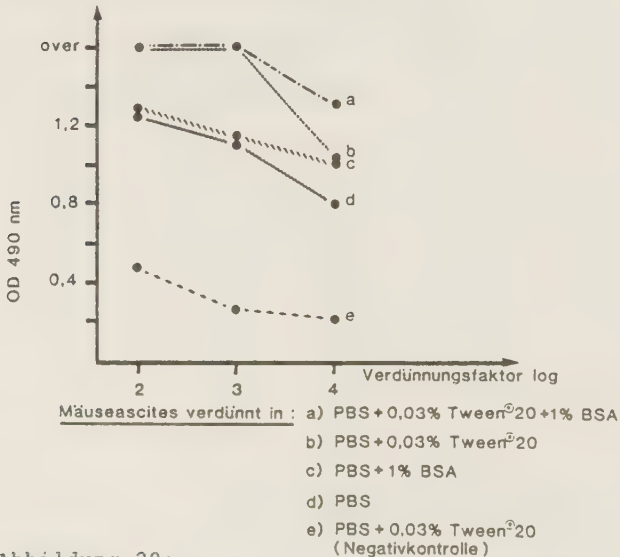


Abbildung 20:

Einfluß verschiedener Faktoren auf den Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA mittels ELISA:

Einfluß verschiedener Puffer

von PBS, PBS mit 0,03% Tween[®] 20, PBS mit 1% BSA, sowie PBS mit 0,03%Tween[®] 20 und 1% BSA. Wie Abbildung 20 verdeutlicht, stellen sich deutliche Unterschiede mit OD-Differenzen von maximal 0,5 dar, wobei die Unterscheidung zwischen Positiv- und Negativkontrolle jedoch eindeutig bleibt. Der Übersichtlichkeit halber ist nur eine Negativkontrolle aufgezeichnet, da sich diese Kontrollen kaum voneinander kontrastierten. Wenn Probenverdünnungen angefertigt werden mußten, wurde dies mit einem PBS-Puffer, welcher 0,03% Tween[®] 20 und 1% BSA enthielt, getan.

3. Diskussion

3.1. Bestimmungsmethode: Enzymimmunoassay

Den Enzymimmuntechniken liegt zugrunde, daß mit einem Enzym der Nachweis eines Immunkomplexes geführt wird. Dabei sind homogene und heterogene Varianten zu unterscheiden. Beim heterogen Assay werden Antigen (Ag) oder Ak an eine feste Phase gebunden und in mehreren Waschprozessen, die nicht an der Immunreaktion beteiligten Reagentien eliminiert (31). Daraus wird ersichtlich, daß der Bindung an die feste Phase eine große Bedeutung zukommt. Der Nachweis der Bindung von CsA an PVC wurde mit [^3H]CsA geführt. Dabei wurde die Konzentration von radioaktivem CsA in Kombination mit unmarkiertem CsA stufenweise soweit verringert, bis die radioaktive Komponente nicht mehr nachweisbar war. Bei dieser Art der Nachweisführung ist zu beachten, daß die zugesetzte Radioaktivität/CsA-Molekül so groß ist, daß mit einer kleinen Menge von CsA-Molekülen eine Messung möglich wird. Damit keine entscheidende konkurrierende Bindung von markiertem und unmarkiertem CsA eintritt, muß das Verhältnis von radioaktivem zu "kaltem" CsA weit zugunsten der Ursubstanz gewählt werden. Das bedingt dann allerdings, daß an der Nachweisgrenze der Radioaktivität dennoch CsA gebunden ist, diese Bindung aber nicht meßbar gemacht werden kann. In unseren Versuchen konnten mit Beschichtungen von 2 bis 0,25 µg/Microtiterplattenvertiefung noch der sichere Nachweis der Bindung erbracht werden. Weil aber durch verschiedene

Plattenbehandlungsprozeduren die ursprüngliche Beschichtung um ca. 80% reduziert wurde, entspricht dieser Wert einer effektiven Bindung von ca. 400-40ng/Vertiefung. Andererseits mußte aber auch gezeigt werden, daß eine Beschichtung von effektiv ca. 400ng/Loch zur Bindung der CsA-Ak-Moleküle ausreichend ist. Dies konnte unter Verwendung von CsA-haltigem Schafserum mittels anti-Schaf-IgG-peroxidasemarkierter Ak gezeigt werden. Nun läßt sich der Nachweis im Schafmodell nicht automatisch auf die Meßbarkeit im Mäusemodell übertragen, so daß ähnliche Experimente unter Verwendung von Mäuseren mit vorher nachgewiesenen CsA-Ak-Gehalt notwendig waren. Entscheidend ist, daß eine unspezifische Bindung von Ak an die feste Phase sicher ausgeschlossen wird. Insofern sind die Negativkontrollen besonders wichtig.

Mit Hilfe der Negativkontrollen muß weiterhin ausgeschlossen werden, daß der verwendete enzymmarkierte Ak unspezifisch mit speziesspezifischen Merkmalen reagiert. Eine entsprechende Resorption von so reagierenden Ak durch Vorinkubation der enzymmarkierten Ak mit Lymphozyten der ausgewählten Tierspezies kann notwendig sein. Solcherart vorbehandelte enzymmarkierte Ak sollten dann aber wieder auf ihre Tauglichkeit im angestrebten Assay getestet werden, weil die Möglichkeit des Wirkungsverlustes durch Verdünnung, pH-Inkompatibilitäten u.a. gegeben ist. Auch muß die Wirksamkeit der Enzym-Substratreaktion zuerst getrennt vom erwünschten Assay sichergestellt werden. Zu der von uns verwendeten Meerrettich - Peroxidase - H_2O_2 - Orthophenyldiamin (=OPD) - Reaktion gibt es eine Vielzahl von Alternativen. So

kann als Indikator statt OPD auch Orthodianisidin oder Azido-diäthyl-benzthiazolinsulfat (ABTS) eingesetzt werden. Statt Peroxidase kann die Enzymmarkierung in der Bindung von Glukoseoxidase, β -Galaktosidase oder alkalischer Phosphatase bestehen, wobei jedes Enzym dann seinen passenden Indikator beansprucht (109). Ein Peroxidase-Nachweissystem kann aber nur bedingt bei Anwesenheit von endogener Peroxidase, wie sie z.B. in Granulozyten und mit Hämoglobin abläuft, eingesetzt werden (105). Eine weitere, zu prüfende Phase des Assays ist die Stoppung der Enzymsubstratreaktion. Bei der Verwendung einer Peroxidasereaktion kann durch Änderung des pH-Wertes z.B. durch Zugabe von HCl, H_2SO_4 oder NaOH die Farbentwicklung zum Stillstand gebracht werden. Je nach verwendetem Indikator und Abstoppreagens muß die Messung der optischen Dichte bei einer bestimmten Wellenlänge erfolgen. Für die Peroxidasereaktion mit Stop durch Schwefelsäurezugabe hat sich 490nm und bei besonders starker Farbentwicklung 450nm bewährt. Nach der Normierung der sechs Schritte eines ELISA, nämlich Ag-Bindung, Ak-Bindung, Bindung von enzymgekoppeltem Ak, Enzymsubstratreaktion, Stop dieser Reaktion und Messung der optischen Dichte, kann die Bestimmung des gewünschten Ak in Zellkulturüberständen erfolgen.

Durch Vorinkubation mit Albumin bzw. Albuminzusatz im Medium konnte ausgeschlossen werden, daß es sich bei den erzeugten Ak um einen pAk oder mAk gegen Albumin handelt. Im übrigen wurde als Kopplungsprotein nicht Albumin, sondern Thyreoglobulin verwendet. Weil sich aber die Meßergebnisse durch die

Zugabe von BSA zu Verdünnungspuffer und spezies-spezifischem Ak verbesserten, könnte Albumin einen proteinstabilisierenden Effekt ausüben (72), insbesondere da zur Steigerung der Sensitivität die Ak in niedrigsten (ng) Konzentrationen vorliegen. Ebenso ist die Empfindlichkeit verschiedener Ak gegenüber Detergentien, wie sie in einigen Puffern eingesetzt werden, bekannt. Bei der Behandlung der PVC-Mikrotiterplatten wurde ebenfalls BSA verwendet, um die unspezifisch bindenden Stellen auf der versiegelten PVC-Oberfläche abzusättigen (104). Trotz dieser Maßnahme war es immer noch möglich, mit Platten, welche einzig mit BSA behandelt worden waren, zwischen CsA-Ak-haltigen und Kontrollproben zu unterscheiden. Da sowohl bei pAk als auch bei mAk eine solche Bestimmung gelang, dabei aber die Negativkontrollen immer im vorher ermittelten Bereich blieben, kann es sich nicht um eine unspezifische Bindungsreaktion handeln. Vielmehr muß diskutiert werden, ob der CsA-Ak bestimmte lipophile Gruppen der PVC-Oberfläche oder besondere Determinanten von anderen chemischen Substanzen, welche z.B. dem PVC beigemischt sind (Weichmacher), als Antigen erkennt. Eine Freilegung der Oberflächenversiegelung durch Äthanolwirkung könnte dabei einen besseren Zugang zu den Epitopen der Ak schaffen. An PVC-Kügelchen, deren Zusammensetzung genau den Bestandteilen einer Microtiterplatte entspricht, wäre dann eine selektive Bindung von CsA-Ak möglich. Bisher scheiterte dies an der Materialbeschaffenheit der erhältlichen PVC-Granulate. Leider konnten aus Polystyrol hergestellte Microtiterplatten zum Aufbau eines ELISA nicht verwendet werden, da die

Bindung von CsA an die Plattenoberfläche nicht ausreichend gewährleistet werden konnte (64). Auch konnte auf andere Immunoassays nicht übergegangen werden, da sie sich bereits als zu wenig empfindlich herausgestellt hatten (Radioassay) oder wegen der schwierigen Handbarkeit von CsA (extreme Hydrophobie) nicht eingesetzt werden konnten. Seit Mitte 1985 gibt es allerdings von QUESNIAUX (83) die Beschreibung für einen ELISA zum Nachweis von mAk gegen CsA, bei welchem an die feste Phase statt CsA verschiedene über Carbodiimide gekoppelte CsA-BSA-Konjugate oder einzeln Ovalbumin, Lysozym und andere Substanzen gebunden werden. Diese Methode beruht also nicht auf einer direkten Testung, sondern auf dem Ausschluß der AK-Reaktion mit anderen Ag. Ein Nachweis von CsA-mAk durch direkte Bestimmung der mAk-CsA-Bindung wäre jedoch bei entsprechender Sensitivität vorzuziehen.

3.3. Zellkulturmethoden

Während die chemischen Eigenschaften von CsA große technische Probleme mit sich brachten und die Methodenwahl dadurch limitiert war, bot die Durchführung der Zellfusion und Selektion keine entscheidenden Schwierigkeiten, wenn man von den allgemeinen Komplikationen jeglicher Zellkulturarbeit (Sterilitätsfrage, Herstellung idealer Vitalitätsparameter) einmal absieht. Alternativ zu den von uns verwendeten Verfahren wäre z. B. der Einsatz von HAT-Medium nicht sofort nach der Zellfusion, sondern erst einen Tag später möglich. Diskutiert wird auch die Möglichkeit der Produktion mAk in

serumfreiem Medium (15). Mit dem Ersatz von FCS durch Clex[®] konnten bei unseren Versuchen adäquate Fusionsraten und Vitalitätsparameter auch in Mikrokulturen gefunden werden. Empfohlen wird weiterhin, schon nach 8 Tagen eine orientierende Untersuchung auf die Sekretion von Immunglobulinen ohne Angabe von näheren Eigenschaften vorzunehmen (69,108). Wenn jedoch normale Lymphozyten als feeder cells eingesetzt werden, ist die Differenzierung zwischen Hybridzell-Ak und Lymphozyten-Ak dadurch nicht möglich. Die Verwendung von Peritonealmakrophagen als Feederzellen birgt jedoch ein größeres Risiko der Kontamination mit unsterilen Elementen, so daß auf diese Möglichkeit der frühzeitigen Austestung verzichtet wurde, insbesondere auch deshalb, weil sie nur unspezifisch Ak-Präsenz aufzeigt (74). Ebenfalls ein erhöhtes Risiko zur Unsterilität weist das Verfahren auf, aus mikroskopisch lokalisierten Klonen einzelne Zellpopulationen durch Herauspicken zu isolieren.

Eine andere Methode der Klonierung stellt die Soft-agar-Technik dar. Sie eignet sich für hydrophile Substanzen, z.B. zur Erzielung von Hämolysen oder Immunpräzipitaten (31). Dann erlaubt diese Methode ebenfalls eine direkte Testung wie das Limiting-dilution-Verfahren. Ansonsten ist eine Wiederaufnahme der in soft Agar ausgesäten Hybridome in flüssiges Medium unumgänglich (90). Weil Diffusionsverfahren mit CsA nicht praktikabel sind, wurde nur die Limiting-dilution-Technik benutzt. Häufig wird als Kriterium der Monoklonalität angegeben, daß eine drei- bis viermal regelgerecht durchgeführte Limiting dilution dies verbürge. Dies

impliziert, daß aus jeder Verdünnungsaktion nur diejenigen Klone weitergezüchtet werden, welche sich als stabil erwiesen und aus einer Kultur entnommen wurden, die aus einer Zelle hervorgegangen ist. Besonders bei den anfänglichen Limiting dilutions ist es manchmal gar nicht möglich, aus einem solchen Bereich Zellen zu verwenden, da sie nicht die relevanten Ak produzieren (125). Um sicherzugehen, daß monoklonale Ak vorliegen, wurden sechs Reklonierungsschritte vorgenommen. Eine weitere Möglichkeit des biochemischen Nachweises der Einheitlichkeit mAk kann durch ^{14}C -Leucin-Markierung der Hybridom-Ak und Analyse der Zellkulturüberstände mittels Elektrofokussierung und Gel-Elektrophorese erfolgen (31). Auf genauere Einzelheiten wird im Kapitel Ak-Charakterisierung eingegangen werden.

Teil B: Kapitel V

Antikörpergroßproduktion und Antikörperanreicherung

1. Material und Methoden
 - 1.1. Antikörpergroßproduktion in vivo
 - 1.2. Anreicherung durch Ammoniumsulfatfällung
 - 1.3. Anreicherung durch Affinitätschromatographie
2. Ergebnisse
 - 2.1. Nachweis von Ciclosporin-Antikörpern in Ascites
 - 2.2. Nachweis von Ciclosporin-Antikörpern nach Anreicherungsverfahren
3. Diskussion

1. Material und Methoden

1.1. Antikörpergroßproduktion in vivo

Material:

2,6,10,14 Tetramethylpentadecane (Pristan[®]; Sigma, St.Louis, USA)

10⁷ Hybride/ml Hankscher'scher Lsg.

steriles Injektionsmaterial

Vorgehen:

Balb/c-Mäuse erhalten je 0,1ml Pristan[®] intraperitoneal (i.p.). Nach 14-21 Tagen werden pro Tier 5 x 10⁶ lebende Hybridomzellen in 0,5ml Hank'scher Lösung i.p. injiziert, nachdem die Zellen vorher mehrmals gewaschen worden sind (siehe II.1.2.4.). Am Tag 10, 12 und 14 und falls möglich weiter in zweitägigem Abstand werden die Mäuse zur Ascitesgewinnung punktiert. Die gewonnenen Proben werden 10min bei 20000g zentrifugiert, der klare Ascites abpipettiert, im ELISA oder RA ausgetestet und bei -20°C gelagert. Es empfiehlt sich, die Proben sofort einzufrieren und je Probe 0,5ml Ascites zur Austestung vorher abzunehmen.

1.2. Anreicherung durch Ammoniumsulfatfällung

Material:

Ak-haltige Ascitesprobe

100ml Aqua bidest.

71g (NH₄)₂SO₄ (Merck, Darmstadt)

1 x PBS (siehe IV.1.1)

Zentrifugenröhrchen

Dialyseschlauch Thomapor[®] (Reichert-Chemie, Heidelberg, Nr.94568)

Pipetten

Magnetrührer

Zentrifuge (20000g)

Eisbad

Vorgehen:

Im Eisbad wird eine gesättigte Ammoniumsulfatlsg. (A.s.lsg.) hergestellt. Die Ascitesprobe wird in einem Zentrifugenröhrchen auf 4°C abkühlt und dann im Verhältnis 1:1 die gesättigte A.s.lsg. tropfenweise zugegeben. Unter vorsichtigem Rühren verbleibt das Gemisch 1h im Eisbad. Danach wird die Probe 10min bei 20000 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Das Präzipitat wird 16h lang dialysiert, wobei die Dialyselsg. mehrmals gewechselt werden sollte.

1.3. Anreicherung durch Affinitätschromatographie

Material:

Ak-haltige Probe (am besten vorher ammoniumsulfatgefällt)

1,5g Protein A-Sepharose CL 4B (LKB, Gräfelfing)

PBS (siehe IV.1.1.)

Tris/HCl-Puffer (0,05 Tris, 0,15 M NaCl, 0,02% NaN₃ mit 10M HCl auf pH 8,6 eingestellt)

Acetat-Puffer (0,05M Acetat, 0,15M NaCl, mit Essigsäure auf pH 4,3 eingestellt)

Glycin-Puffer (0,05M Glycin, 0,15M NaCl, mit 10M HCl auf pH 2,3 eingestellt)

Säule (Biorad, München)

Sammelröhrchen

pH-Meter

Fraktionensammler

UV-Monitor (LKB, Gräfelfing)

Vorgehen:

Die Protein A-Sepharose läßt man in 5-6ml Tris-Puffer quellen und füllt ein Volumen von 5-6ml in die Säule. Die Säule wird mit Trispuffer kurz gewaschen, die Probe aufgetragen und nochmals mit Trispuffer gewaschen bis auf dem UV-Monitor die Extinktion an ihren Ausgangswert zurückgekehrt ist. Nun wird mit PBS gewaschen wie beschrieben. Schließlich wird die Elution noch mit dem Acetat- und dem Glycinpuffer durchgeführt. Die einzelnen Fraktionen werden jeweils gesammelt, wobei die Ak enthaltenden Fraktionen möglichst schnell wieder in einen physiologischen Pufferbereich gebracht werden sollen. Eine Säule in dieser Größe ist für 10-60mg Immunglobulin geeignet. Die Bindung der Ak erfolgt in der alkalischen und die Elution pH-abhängig in der sauren Phase.

2. Ergebnisse

2.1. Nachweis von Ciclosporin-Ak in Ascites

Um eine Steigerung der Ak-Produktion zu erzielen, wurde eine Zellkulturpatrone (Holofiber, Amicon, Oosterhood, Holland) eingesetzt. Leider ließen sich wegen technischer Probleme keine adäquaten Bedingungen herstellen, welche die längerzeitige Züchtung von Hybridzellen in einem Lamellarfilter ermöglicht hätte. Weil in vitro keine höheren Ak-Konzentrationen zu erreichen waren, wurde auf die in vivo Produktion übergegangen. Mit Tetramethylpentadecan vorsensibilisierte Balb/c-Mäuse erhielten 5×10^6 CsA-Ak-produzierende Hybridome intraperitoneal injiziert. Ab dem 10. Tag wurde in

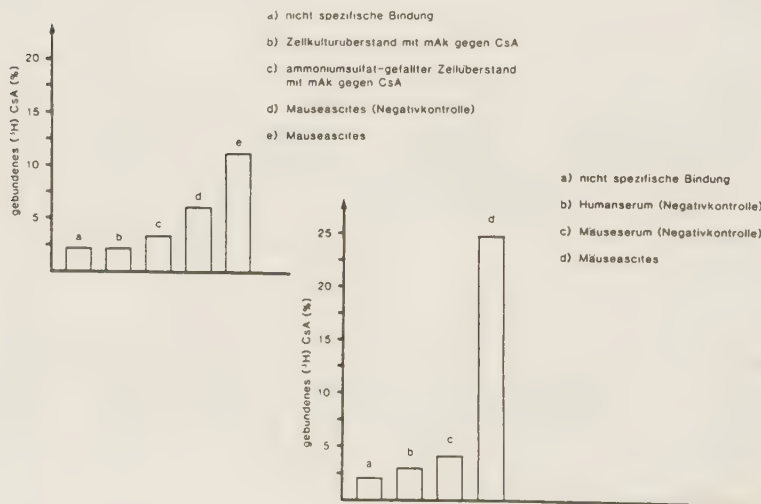


Abbildung 21:

Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA in Ascites mittels [3 H]CsA (Radioassay)

zweitägigem Abstand durch Punktion Ascites gewonnen. Tafel 3 zeigt ein nach Pappenheim gefärbtes Ausstrichpräparat einer nach 10 Tagen entnommenen Ascitesprobe. In der Übersicht lassen sich massenhaft die injizierten Hybridzellen wiederfinden, während die Vergrößerung die hyperchromatischen Hybridome inmitten mäuseeigener Lymphozyten zeigt. Bei den rosafarbenen, konturlosen Gebilden handelt es sich um ausgetretene Kernsubstanzen der Tumorzellen (vgl. 102). Nicht nur mikroskopisch, sondern auch laborchemisch konnten das Wachstum der fusionierten und geklonten Zellen und damit verbunden die CsA-Ak-Produktion nachgewiesen werden. Die Ascitesproben wurden einzeln im ELISA ausgetestet, nachdem sie im RA auf die Bindung von [^3H]CsA überprüft worden waren. Die unverdünnten Proben erreichten im RA Bindungsquo-

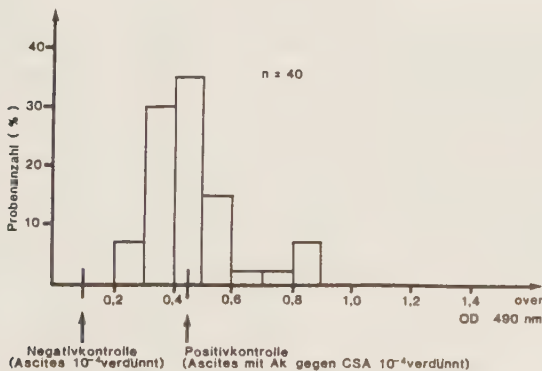


Abbildung 22:
Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA in Ascites mittels ELISA

Häufigkeitsverteilung von Ascitesproben mit und ohne monoklonale Ak gegen CSA (nach intraperitonealer Injektion von 5x10⁶ Hybridomazellen bei Balb/c-Mäusen)

ten von 10 bis maximal 25% des eingesetzten radioaktiven CsA. Abbildung 21 gibt dieses Ergebnis im Vergleich zu verschiedenen Negativkontrollen, sowie CsA-Ak-haltigen Zellkulturüberständen wieder. Zum Vergleich sei nochmals erwähnt, daß die polyklonalen Mäuseseren in unverdünntem Zustand wegen Ak-Überschuß nicht effizient ausgetestet werden konnten und bei einer Verdünnung von 1:32 noch Bindungsquoten von über 30% vorlagen. Eine zweite Probenserie, deren Gesamtzahl 40 betrug, wurde zusätzlich im ELISA ausgetestet und mit einer im RA als positiv eingestuften Probe verglichen (Abb.22). Beste Differenzierungsmöglichkeiten ergaben sich bei einer Vorverdünnung der Ascitesproben von 10^{-3} bis 10^{-4} . 64% der ausgewerteten Proben wiesen gleichwertige oder höhere Extinktionswerte als die Positivkontrolle auf. Diese Proben wurden für weitere Untersuchungen verwendet.

2.2. Nachweis von Ciclosporin-Antikörpern nach Anreicherungsverfahren

Aus dieser Gruppe wurden drei Ascitesproben, welche vom gleichen Tier in den angegebenen Zeitspannen gewonnen worden waren, nochmals in Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-5} ausgetestet, gepoolt und miteinander verglichen (Abb.23 c,e,f). Aus den erwarteten mittelwertigen Meßdaten konnte die in Abbildung 23 mit d) bezeichnete Kurve erstellt werden. Durch Ammoniumsulfatfällung (38) dieses gepoolten Ascites wurde die relative Immunglobulinkonzentration von vorher 26,2% auf nunmehr 63,3% angehoben. Bei einer Salzpräzipitation ge-

schiebt das hauptsächlich durch Reduzierung des Albuminanteils, der sich von 60,4% auf 14,9% verringerte. Neben der Gammaglobulinanreicherung findet auch eine geringgradige Vermehrung der α_1 -, α_2 - und β -Fraktion statt, wie die Proteinelektrophorese in Abbildung 24 verdeutlicht. Die ELISA-Auswertung der ammoniumsulfatgefällten (a.s.g.) Probe ergab, daß sich die angereicherte Probe nun für Verdünnungen von bis zu 1:5000 außerhalb des oberen Meßbereiches befindet. Für Verdünnungen, wie sie zur Ascitestestung vorgenommen werden, zeigten sich deutlich höhere Meßwerte der optischen Dichte (Ascites: 0,74; a.s.g. Ascites: 1,20; Verdünnung 1:5000). Ein derartiger ELISA erlaubt nicht nur, eine Anreicherung der Ak-Konzentration zu dokumentieren, sondern auch eine Qualitätskontrolle der ausgeführten Ammoniumsulfatfällung.

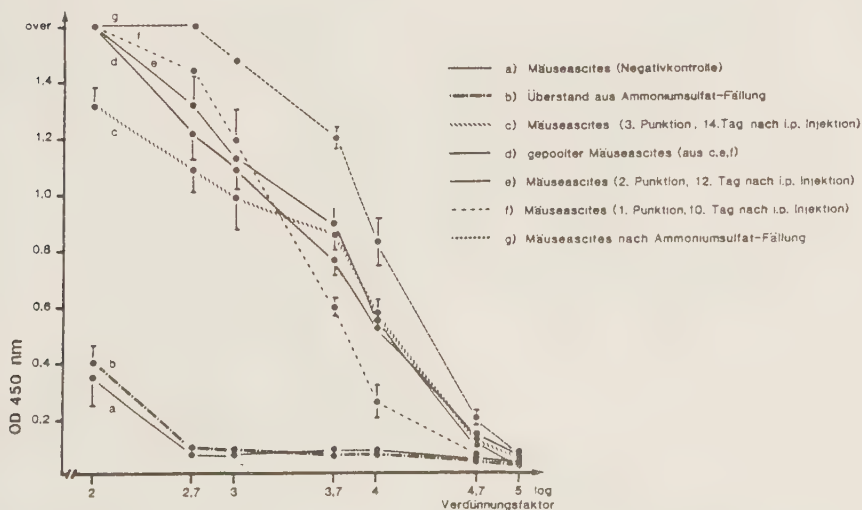
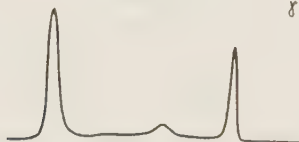


Abbildung 23:

Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA in ammoniumsulfatgefälltem Ascites mittels ELISA

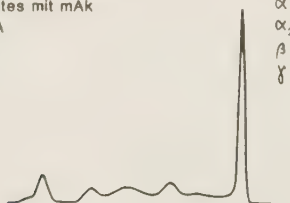
Im Überstand über dem Salzpräzipitat sollten sich keine Ak mehr befinden. Kurve b in Abbildung 23 stellt die Bestimmung eines solchen Überstandes dar. Eine Gegenüberstellung von Ascites-, a.s.g. Ascites- und Mäuseserumproben, einerseits mit, andererseits ohne spezifische CsA-Ak, wurde nach beschriebenem ELISA-Verfahren durchgeführt, wobei die Messung der optischen Dichte nicht mit einem Automatic-ELISA-Reader der Fa. Dynatech, sondern mit einem Gerät der Fa. LKB, erfolgte. Hiermit kann für eine Wellenlänge von 490nm der Bereich der optischen Dichte, in dem Linearität vorliegt, bis auf 2,9 ausgedehnt werden (Abb. 25). Die Meßwerte für äquivalente Verdünnungen von Ascites und Serum unterscheiden sich um ca.1,0, wobei die nicht angereicherten Ascitesproben die höheren Meßwerte erbrachten. Mit einem Sigifikanz-

Mäuseascites mit mAk
gegen CsA



Albumin	60,4 %
α_1	2,0 %
α_2	3,4 %
β	8,0 %
γ	<u>26,2 %</u>
	100 %

Ammoniumsulfat-gefällter
Mäuseascites mit mAk
gegen CsA



Albumin	14,9 %
α_1	5,4 %
α_2	7,6 %
β	8,5 %
γ	<u>63,6 %</u>
	100 %

Abbildung 24:
Proteinelektrophorese von Ascites und ammoniumsulfatge-
fälltem Ascites

niveau von $\alpha = 0,001$ konnte der Unterschied von CsA-haltigen zu non-CsA-haltigen Proben angegeben werden.

Während Proben, die mAk enthielten, mit der Ammoniumsulfat-fällung angereichert wurden, wurden Mäuse- und Kaninchen-seren mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Dabei werden die Immunglobuline unter alkalischem Milieu an eine Protein A-Sepharose-Säule spezifisch gebunden und mit saurem Puffer wieder eluiert (Abb.26). Die Bindungsfähigkeit hängt von der Spezies und der Ak-Subklasse ab. Maus-IgG₁ und IgM bindet nur sehr schwach, Maus-IgG_{2a}, IgG_{2b} oder IgG₃ dagegen stark, so daß die Protein A- Affinitätschromatographie nur für die zuletzt genannten Ak in Betracht kommt. Die entsprechende Elutionsdauer richtet sich nach den gemessenen Extinktions- bzw. Transmissionswerten. Mit einem pH von 4,3

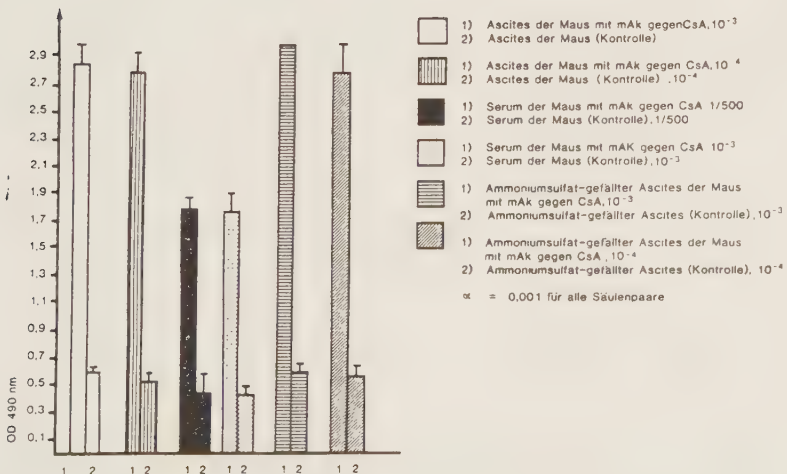


Abbildung 25:

Nachweis von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen CsA in Ascites und Serum mittels ELISA

4ml anti-CsA-Kaninchen-Serum

Säule $\varnothing$ 1cm
h = 4cm

Kopplung: 0,5 ml/min

Elution: 1 ml/min



Abbildung 26:

Protein-A-Sepharose Affinitätschromatographie von Kaninchen-serum mit polyklonalen Antikörpern gegen CsA

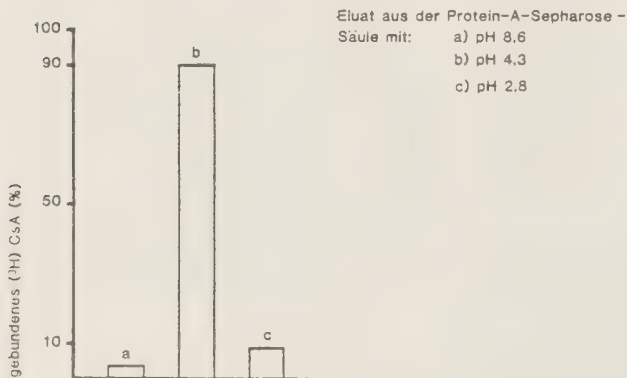


Abbildung 27:

Nachweis von Antikörpern gegen CsA mittels [^3H]CsA (Radioassay)

Probenmaterial: verschiedene Eluate von affinitätschromatographisch aufbereitete Kaninchenserum

mit Ak gegen CsA

werden hauptsächlich IgG_{2a} und IgG₃ von der Säule gelöst. Bei noch niedrigerem pH-Wert wird die Bindung von IgG_{2b} an Protein A wieder gelöst (30). Daß sich jedoch der weitaus größte Teil der CsA-Ak im Eluat der pH 4,0 -Fraktion befindet, konnte mit dem RA bestätigt werden (Abb.27). Bei dem in Abbildung 26 dargestellten Protokoll der Affinitätschromatographie und der in Bild 27 wiedergegebenen Austestung der somit entstandenen Eluatfraktionen wurde Kaninchenserum mit pAk gegen CsA eingesetzt. Auch diese Reinigungsmethode liefert eine deutliche Anhebung der spezifischen Ak-Aktivität, wie ein Vergleich von äquivalent verdünntem Kaninchenserum mit dem Eluat zeigt (Abb.28). Sogar bei einer Eluatverdünung von 1:729 konnten im RA noch Bindungsquoten von 27% nachgewiesen werden. Die Positivkontrolle der Fa.Sandoz läßt

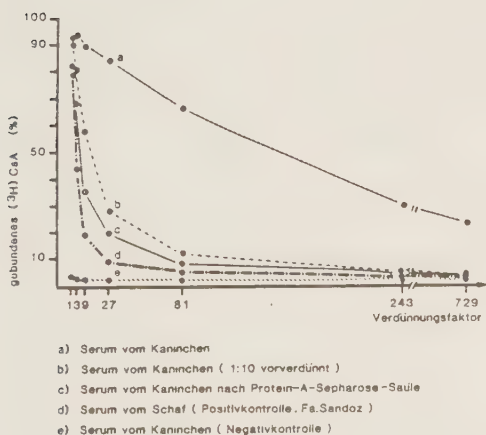


Abbildung 28:

Nachweis von Antikörpern gegen CsA mittels [^3H]CsA in affinitätschromatografisch aufbereitetem Kaninchenserum (Radioassay)

sich dagegen schon bei einer Verdünnung von 1:81 nicht mehr vom Bereich der unspezifischen Bindung abgrenzen (Näheres zum RA siehe I.2.). Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei der affinitätschromatographischen Reinigung von Mäuseserum mit polyklonalen Ak gegen CsA erzielt werden.

3. Diskussion

Im allgemeinen enthält ein Liter Kulturüberstand bis zu 50mg mAk, während die Konzentrationen in Ascites und Serum sich zwischen 1mg bis 15mg bewegen (5, 55). Diese Werte gelten für Ak der Klasse IgG und sind für IgM-Ak um ein Vielfaches niedriger. Das Ziel der Ak-Großproduktion ist, einen Ak herzustellen, der sich aus einer Lösung selektieren läßt, welche möglichst wenig durch andere Proteine verunreinigt ist. Werden in vivo Methoden zur Ak-Herstellung eingesetzt, ist die Verunreinigung groß, werden in vitro Verfahren verwendet, ist die Ausbeute gering. Zwar gibt es Zellkulturpatronen, die in einem Lamellenfilter die Hybridzellen kultivieren und durch ständigen Durchfluß von Medium die Versorgung der Zellen sicherstellen, um damit bis zu 1000 mal höhere Konzentrationen als in Kulturüberständen zu erzeugen. Doch scheint diese Art der Kultivierung nicht für jede Hybridzelle geeignet zu sein. SJÖGREN-JANSSON (95) beschreibt eine Methode der Ak-Großproduktion unter Verwendung von Dialyseröhrchen und gibt erreichte Ak-Konzentrationen von bis zu 5,4mg/ml Kulturüberstand an. In industriellem Rahmen werden Mikroenkapselungsverfahren für lebende Zellen angeboten, die Konzentrationen innerhalb der Kapsel ergeben sollen, welche mit Serumkonzentrationen vergleichbar sind (47). Wenn solche Methoden auch für IgM-Ak einsatzfähig und dabei finanzierbar wären, könnten in vivo Verfahren umgangen werden, obwohl durch verbesserte Techniken (62,78) immer höhere Ak-Konzentrationen erzielt werden können.

Die eigentliche Frage der Konzentration an spezifischem Ak in polyklonalen Seren oder in Ascites mit Hybridzell-Ak läßt sich nur dann genau beantworten, wenn es möglich ist, allein diesen Ak aus einer Vielzahl anderer Proteine, wie sie sich in jedem Serum befinden, zu isolieren. Unterzieht man Ak-haltigen Mäuseascites einer Ammoniumsulfatfällung, so reichern sich zwar auch die Immunglobuline an, doch handelt es sich hierbei um eine unspezifische Anreicherung der maus-eigenen und der Hybridom-Immunglobuline. Eine spezifische Anreicherung einiger Immunglobulinklassen (IgG_{2a} , IgG_{2b} , IgG_3) gelingt mit der Protein A-Sepharose-Affinitätschromatographie (43). Eine spezifische Anreicherung von CsA-Ak wäre mit einer HPLC denkbar. Da uns diese Möglichkeit nicht zur Verfügung stand und sich wegen der Ak-Subklasse (siehe auch Kapitel VI.) Ascites mit mAk weder mittels Ionenaustauschchromatographie, sei es nun mit Acrylamid (DEAE-Biogel), Agarose (DEAE-Sepharose) oder Zellulose (DEAE-Sephacel), noch mittels Affinitätschromatographie reinigen läßt (33,118), konnten nur polyklonale Seren mit der zuletzt genannten Methode angereichert werden. Weil es sich bei dem hergestellten mAk um einen Ak der IgM-Subklasse handelt, wären Anreicherungen mit der Euglobulinfällung (14), einer Hydroxylapatit-HPLC (12,48,104), einer spezifischen Anti-IgM-Säule oder einer mit CsC (an deren hydrophilen Gruppe) gekoppelten Chromatographiesäule denkbar. Leider konnten diese Methoden mit Ausnahme der Euglobulinfällung nicht angewendet werden, weil sie entweder eine zu geringe Affini-

tät zum spezifischen Ak aufwiesen oder nicht zur Verfügung standen. Neben dem Problem der Methodenwahl bietet jedes Anreicherungsverfahren (mit Ausnahme der Fällungen) den Nachteil, daß durch aufwendige Koppelungen und anschließende Elutionen Material einerseits verlorengeht, andererseits z.T. Verdünnungen im Vergleich zum Ausgangsmaterials geschaffen werden, die anschließend wieder eingeeengt werden müssen, was weiteren Materialverlust mit sich bringt. Ein anderer Punkt ist die Bestimmbarkeit der effektiven Konzentration an spezifischen Ak. Während relative Konzentrationsangaben (z.B. Vergleich verschiedener Verdünnungen miteinander) gut erhoben werden können, ist die Angabe von Absolutmengen in ng/ml bei Zellkulturüberständen eigentlich eine indirekte, weil dort die Menge an subklassenspezifischem Ak bestimmt wird, was bei der Verwendung von serumfreiem Medium sicher zulässig ist. Andererseits ist eine mengenmäßige Ak-Bestimmung in polyklonalen Seren für CsA-Ak aufgrund noch nicht publizierter Epitopstudien (9) sowie nicht bekanntgemachter Angaben (auch auf Anfrage bei der Fa.Sandoz) über die spezifische Aktivität des eingesetzten [^3H]CsA nur annäherungsweise möglich, so daß in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde.

Teil B: Kapitel VI

Antikörpercharakterisierung

1. Material und Methoden
 - 1.1. Ouchterlony-Immundiffusion
 - 1.2. Immunelektrophorese
 - 1.3. Subklassen-ELISA
2. Ergebnisse und Diskussion

Zur näheren Charakterisierung eines Ak wird im allgemeinen sein Verhalten bei verschiedenen Antigen-Antikörperreaktionen überprüft. Dabei werden Immundiffusions-, Elektroimmuno-, Immunfluoreszenz-, Radioimmun-, Enzymimmuntechniken und Komplementbestimmungen eingesetzt. Besonders wichtig sind die Bestimmung der molekularen Struktur und damit der Ak-Subklasse (für Mäuse vorallem: IgG_1 , IgG_{2a} , IgG_{2b} , IgG_3 , IgM) sowie die Identifikation der Ketten (41). Ob es noch weitere Unterklassen (z.B. für IgM IgM_1 und IgM_2) gibt, soll hier nicht behandelt werden. Wie schon in Kapitel V. beschrieben, ist dieses Wissen vorallem für die Anwendung von Anreicherungsverfahren zwingend notwendig. Die spezifischen Eigenschaften eines Ak, wie z.B. Affinität zum Ag oder Epitopangriffsort, können zu den entscheidenden Kriterien für die Einsatzfähigkeit mAk werden. Für andere Ziele ist die Komplementaktivierung oder die Möglichkeit der Kopplung von chemischen Substanzen an den Ak entscheidend. Im folgenden wird

* die Charakterisierung des mAk gegen CsA

dargelegt werden.

1. Material und Methoden

1.1. Ouchterlony-Immuddiffusion

Material:

auszutestende Probe (Ascites, Zellkulturüberstand)

Antiseren (Antimäus-IgG₁, -IgG_{2a}, -IgG_{2b}, -IgG₃, -IgM, -IgGAMDE; Nordic, Tilburg, Niederlande)

1 x PBS (siehe IV 1.1.)

0,1M NaCl

Färbelösung (11 Entfärbesg., 0,7g Serva Blau G reinst; Serva, Heidelberg)

Entfärbelösung (9Vol./9Vol./2Vol. Äthanol/Aqua bidest./Eisessig)

0,8g Agarose (research grade; Serva, Heidelberg, Nr.11397)

1,0g Polyäthylenglykol (MG 4000; Serva, Heidelberg)

Gel-Bond-Film (84mm x 94 mm; LKB, Grärfelfing)

Filterpapier (Whatman Nr.1; Whatman, Großbritannien)

Zellstoff

Pipetten, Gelstanze, Schablone

Horizontaltisch

Glasplatten (84mm x 94 mm)

1kg Gewicht

Färbeschale

Feuchtkammer (LKB, Grärfelfing)

Pöhn

Vorgehen:

Agarose und PEG werden miteinander vermischt und auf 100ml mit PBS aufgefüllt. Durch Erhitzen auf 100°C wird das Gel hergestellt, welches mit einer vorgewärmten Pipette in Portionen zu 12ml auf je einen Gelfilm gegossen wird. Nachdem das Gel auf dem Horizontaltisch erstarrt ist, werden mit Hilfe einer Schablone Löcher mit einem Durchmesser von 4mm ausgestanzt. Die Löcher werden kreisförmig angeordnet, wobei in jedes Loch ein anderes Antiserum (je 10µl) gegeben wird. In der Mitte des Kreises befindet sich ein ausgestanztes Loch, in welches die auszutestende Probe (10µl) pipettiert wird. Probe und Antiserum läßt man in der Feuchtkammer 24h diffundieren. Auf das Gel wird dann ein mit Aqua bidest. angefeuchtetes Filterpapier, einige Lagen Zellstoff, eine Glasplatte und das Gewicht gelegt und das Gel derart 15min gepreßt. Anschließend wird es über 2h mit NaCl-Lsg. gewaschen, wobei die Waschlsg. mehrfach gewechselt wird. Nachdem das gepreßte Gel 15min in Aqua bidest. gelegen hat, wird es unter einem feuchten Filterpapier mit dem warmen Pöhn getrocknet. Danach bleibt das Gel 10min in der Färbesg. liegen und wird schließlich mit der Entfärbesg. abgespült, bis der Hintergrund des Geles hell ist. Nach kurzem Abspülen mit Aqua bidest. wird der Film unter dem Pöhn getrocknet.

1.2. Immunelektrophorese

Material:

auszutestende Probe (Ascites, Zellkulturüberstand)

Antiseren (Antimäus-IgG₁, -IgG_{2a}, -IgG_{2b}, -IgG₃, -IgM, -IgGAMDE; Nordic, Tilburg, Niederlande)

Trisbarbituratpuffer (22,4g Diäthylbarbitursäure, 44,3g Tris/HCl, 0,533g Ca-lactat, 0,650g NaH₂PO₄; auf 1l mit Aqua bidest. auffüllen, pH 8,6)

1g Agarose (research grade; Serva, Heidelberg, Nr.11397)

Färbelösung. (9Vol./2Vol./3Vol. Äthanol/Essigsäure/Aqua bidest.; auf 140ml davon 0,7g Serva Blau G; Serva, Heidelberg)

Entfärbelösung (9Vol./2Vol./9Vol. Äthanol/Essigsäure/Aqua bidest.)

Gel-Bond-Film (84mm x 94 mm; LKB, Grärfelfing)

Filterpapier (Whatman Nr.1; Whatman, Großbritannien)

Zellstoff

Pipetten, Gelstanze, Schablone
 Horizontaltisch
 Glasplatten (84mm x 94 mm)
 1kg Gewicht
 Färbeschale
 Feuchtkammer (LEB,Gräfelfing)
 Pöhn
 Elektrophoresekammer (LEB,Gräfelfing)

Vorgehen:

Wie in I.1. beschrieben (jedoch ohne PEG) wird ein Agarosegel hergestellt. Dann werden in gleichem Abstand voneinander insgesamt vier 56mm lang und 2mm breite Rillen gestanzt. Das Gel wird aber noch auf der Folie belassen. Rechts und links von jeder Rille werden je ein Loch mit 4mm Durchmesser gestanzt und das Gel entfernt. Die auszutestende Probe wird in die Löcher gefüllt. Nach der 60minütigen Elektrophorese bei 10°C und einer Feldstärke von 10V/cm (konstante Spannung) wird das Gel aus den Schlitzten entfernt und in jede Rille 100µl Antiserum gefüllt. bei 4°C läßt man Antiserum und Antigen 24h diffundieren. Anschließend wird das Gel gepreßt und gewaschen (siehe I.1.). Das gepreßte Gel wird 5min mit Färbelsg. überschichtet, danach kurz mit Aqua bidest. abgespült, entfärbt und schließlich getrocknet.

1.3. Subklassen-ELISA

Material:

auszutestende Proben (Mäuseascites, ammoniumsulfatgefällter Zellkulturüberstand)
 Kontrollseren (Kaninchenserum, Kaninchen-anti-Maus-IgGMA)
 Verdünnungspuffer (0,05% Tween[®] 20, PBS, pH 7,4)
 Waschpuffer (0,1% BSA, 10mM Tris/HCl-Puffer, 0,05% Tween[®] 20, 0,1% Thimerosal, pH 8,0)
 Substratpuffer (17mM Citrat, 65mM Phosphat, pH 6,3)
 Kaninchen-anti-Maus-IgG₁ (γ₁-Ketten-spezifisch)
 Kaninchen-anti-Maus-IgG_{2a} (γ_{2a}-Ketten-spezifisch)
 Kaninchen-anti-Maus-IgG_{2b} (γ_{2b}-Ketten-spezifisch)
 Kaninchen-anti-Maus-IgG₃ (γ₃-Ketten-spezifisch)
 Kaninchen-anti-Maus-IgA (α-Ketten-spezifisch)
 Kaninchen-anti-Maus-IgM (μ-Ketten-spezifisch)
 Kaninchen-anti-Maus kappa leichte Kette
 Kaninchen-anti-Maus lambda leichte Kette
 Ziege-anti-Kaninchen-IgG (leichte und schwere Kette), peroxidasekonjugiert
 4% Orthophenyldiamin (WEM, Dreieich) = OPD
 0,3% H₂O₂ (Merck, Darmstadt)
 4,5M H₂SO₄ (Merck, Darmstadt)
 Pipetten
 beschichtete PVC-Microtiterplatte (siehe III.1.1.2.)
 Wärmeschrank
 ELISA Spektrophotometer (Filter 490nm; Automatic ELISA reader, Dynatech, Nürtingen)

Anmerkung:

Alle Reagentien und die Kontrollseren, sofern nicht anders vermerkt, stammen aus dem MonoAb-ID EIA Kit der Firma Zymed Laboratories (San Francisco, USA; Nr. 50123).

Vorgehen:

Mit dem Verdünnungspuffer werden die Ascitesproben 1:5000 verdünnt. Zellkulturüberstände bleiben unverdünnt. Dannach werden pro Probe 18 Microtiterplattenvertiefungen mit je 50µl der Probe gefüllt und bei 37°C 1h auf der Platte belassen. Es folgt 3-maliges Waschen mit dem o.g. Waschpuffer (siehe III.1.1.2.). Nun wird in jeweils 2 Löcher entweder normales Kaninchenserum oder subklassen-spezifisches Kaninchen-anti-Maus-Ig gegeben (pro Loch 50µl) und 1h bei 37°C inkubiert. Kaninchen-

anti-Maus IgGMA dient als Positivkontrolle. Nach abermaligem Waschen wird in jede Plattenvertiefung 50µl peroxidase-konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-IgG pipettiert und 1h unter denselben Bedingungen inkubiert. Nach dem Waschen folgt die Zugabe von 50µl Substratlsg. (Herstellung siehe III.1.2.). Die Entwicklung der Farbreaktion (Inkubation über 30min bei 37°C) wird mit je 50µl der o.g. Schwefelsäure gestoppt. Die spektrophotometrische Auswertung geschieht bei 490nm.

2. Ergebnisse und Diskussion

Mit der OUCHTERLONY-Immundiffusion (80), der Immunelektrophorese (4) und einem subklassenspezifischen ELISA (110) wurden Zellkulturüberstände, ammoniumsulfatgefällte Zellkulturüberstände und Ascites, der, wie in Kapitel V. beschrieben, gewonnen wurde, ausgetestet. Bei der Austestung von Ascites fanden sich sämtliche Immunglobulinsubklassen (Abb.29). Dies muß in der Tat auch erwartet werden, da dieser Mäuseascites nicht nur die Hybridzell-Ak, sondern auch mauseigene Immunglobuline enthält. Anders dagegen im Zellkulturüberstand: Wenn die Zellnährlösung weder fetales Kälberserum (FCS), noch normale Lymphozyten als feeder layer enthält, entsprechen die bestimmten Ak denen, die von Hybridzellen produziert werden. Leider sind die Konzentrationen in Kulturüberständen so niedrig, daß die Diffusionsmethoden, welche zu einem Ak-Ag-Präzipitat führen, das visuell ausgewertet wird, sich als nicht empfindlich genug erweisen. Wird jedoch Zellkulturüberstand mittels Ammoniumsulfatfällung angereichert, so zeigten sich übereinstimmend bei Immundiffusion und Agarosegelelektrophorese eine Präzipitationslinie bei der IgM-Markierung. Abbildung 30 zeichnet diese Linie und eine zweite auf, bei welcher es sich um ein Gesamtimmunglobulinserum handelt. Dieses Serum diente als Positivkontrolle. Ein wesentlich empfindlicheres Verfahren der Subklassenbestimmung stellt der ELISA dar. Auf Microtiterplatten, die mit CsA kodiert waren (siehe III.1.2.), wurden die oben erwähnten Proben ausgetestet. Dabei konnte

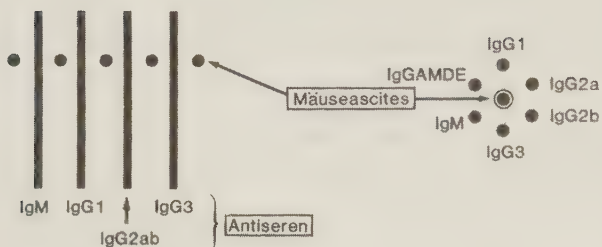
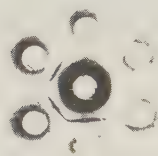
ImmunelektrophoreseOuchterlony

Abbildung 29 (Text siehe Abbildung 30)

ImmunelektrophoreseOuchterlony

Abbildung 30:

Bestimmung der Immunglobulinsubklasse des monoklonalen Antikörpers gegen CsA mittels Immunelektrophorese und Ouchterlony-Immuddiffusion

das Ergebnis, daß es sich bei dem mAk um ein IgM-Molekül handelt, bestätigt und die Anwesenheit der kappa-leichten Kette gezeigt werden. Während die Diffusionsverfahren nicht zwischen relevantem und anderen Ak unterscheiden, gelingt durch die selektive Bindung des gesuchten CsA-Ak an die Microtiterplatte und den folgenden Doppelantikörperrnachweis eine spezifische Subklassentestung. Interessant ist, daß die Subklasse sich auch verändern kann, so daß Hybridomazellen, die zuerst IgG_{2A} produzierten, dann IgG_{2B} herstellten. Aber auch ein Immunglobulinklassenwechsel von IgM zu IgG ist möglich (100). Solche Varianten herauszufinden, wäre auch für den vorliegenden CsA-Ak nicht unbedeutend, da sich ein Immunglobulin der IgM-Klasse mit einem Molekulargewicht (MG) von ca. 900000 u.a. aus sterischen Gründen für die Bindung an ein Ag mit kleinem Molekulargewicht, wie es sich bei CsA (MG ca.1200) handelt, weniger gut eignet (58). Weiterhin sind IgG-Ak besser anreicherbar (z.B. Protein A-Sepharose Affinitätschromatographie), so daß konzentriertere und besser gereinigte Lösungen hergestellt werden können. Zur weiteren Beschreibung der Eigenschaften des CsA-Ak wären natürlich genaue Affinitäts- und Epitopstudien (35,103) wünschenswert, die eine Bestimmung der antigenspezifischen Sequenz von V_L und V_H voraussetzen (45). Dabei handelt es sich um die variablen Regionen auf der leichten bzw. schweren Kette des Ak-Moleküls. Interessant sind die Gruppen und Subgruppen von V_L und V_H sowie die chemische Struktur von iso- und allotypischen Markern (58). Die hauptsächliche Frage ist, inwieweit der vorliegende mAk mit CsA bzw. seinen

Metaboliten reagiert.

Teil B: Kapitel VII

Einsatzmöglichkeiten für monoklonale Ciclosporin-Antikörper

1. Material und Methoden
- 1.1. Beschichtung von Polystyrolmicrotiterplatten mit polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen Ciclosporin
- 1.1.1. Beschichtungsnachweis mittels ELISA
- 1.1.2. Beschichtungsnachweis mittels [^3H]Ciclosporin
- 1.2. Doublesandwich-ELISA
- 1.3. Radioassay
2. Ergebnisse
3. Diskussion

1. Material und Methoden

1.1. Beschichtung von Polystyrolplatten mit pAk und mAk gegen CsA

1.1.1. Beschichtung und deren Nachweis mittels ELISA

Material:

Ascites mit mAk gegen CsA

Ascites mit mAk gegen CsA (ammoniumsulfatgefällt)

Mäuseserum mit pAk gegen CsA

Mäuseserum mit pAk gegen CsA (Protein A-Sepharose-affinitätschromatographisch gereinigt)

Verdünnungspuffer (0,03% Tween Σ 20, PBS, pH 7,4)

Waschpuffer (0,03% Tween Σ 20, 10mM Trishydroxymethylaminomethan, pH 8,0)

Substratpuffer (17mM Citronensäure in 65mM Phosphat, pH 6,3)

Schaf-F(ab')₂-anti-Maus-Immunglobulin, peroxidasekonjugiert

4% Orthophenyldiamin

0,3% H₂O₂ (Merck, Darmstadt)

4,5M H₂SO₄ (Merck, Darmstadt)

bovines Serumalbumin (RIA grade; Sigma, Deisenhofen)

Pipetten

Polystyrolmicrotiterplatte (Dynatech, Nürtingen)

Wärmeschrank

ELISA Spektrophotometer (Filter 490nm; Automatic ELISA reader, Dynatech, Nürtingen)

Anmerkung:

Alle Reagentien, sofern nicht anders vermerkt, stammen aus dem "Monoclonal antibody screening system" der Firma NEN (Dreieich, Nr.NE1601).

Vorgehen:

Mit dem Verdünnungspuffer werden Ascites bzw. Mäuseserum 1:10 bis 1:100000 vorverdünnt. Danach werden je 100 μ l einer Serum/Ascitesprobenverdünnung in eine Microtiterplattenvertiefung pipettiert und über Nacht bei 4°C mit der Platte inkubiert. Die Platten werden mit Waschpuffer dreimal gewaschen (siehe III.1.1.2.), mit 1.5% BSA in PBS 1h bei 37°C belassen und danach nochmals dreimal gewaschen. Es schließt sich der ELISA an, wie er in Kapitel III.1.2. beschrieben ist, jedoch ohne Zugabe von auszutestendem Probenmaterial.

1.1.2. Beschichtungsnachweis mittels [³H]CsA

Material:

Ascites mit mAk gegen CsA

Ascites mit mAk gegen CsA (ammoniumsulfatgefällt)

Mäuseserum mit pAk gegen CsA

Mäuseserum mit pAk gegen CsA (Protein A-Sepharose-affinitätschromatographisch gereinigt)

Kaninchenserum mit pAk gegen CsA (Protein A-Sepharose-affinitätschromatographisch gereinigt)

Verdünnungspuffer (0,03% Tween Σ 20, PBS, pH 7,4)

Waschpuffer (0,03% Tween Σ 20, 10mM Trishydroxymethylaminomethan, pH 8,0)

[³H]CsA-Lsg. (siehe II.1.3.1.)

bovines Serumalbumin (RIA grade; Sigma, Deisenhofen)

Pipetten

Polystyrol-einzelröhrchen (1,0ml; Dynatech, Nürtingen) bzw. flexible Microtiterplatten

Scintillationsröhrchen

Picofluor[®] Scintillationsflüssigkeit

β -Zähler (Model Spectral, LKB-Wallac, Turku, Finnland)

Vorgehen:

Mit dem Verdünnungspuffer werden Ascites, Mäuse- und Kaninchenserum 1:1 bis 1:10 vorverdünnt. In jedes Polystyrolröhrchen werden 200µl Ak-haltige Lsg. (in jede Microtiterplattenvertiefung 100µl) pipettiert, wobei mindestens 8 Röhrchen (8 Vertiefungen) pro Verdünnung eingesetzt werden. Die eine Hälfte der Proben inkubiert 24h bei 4°C, die andere Hälfte 48h bei RT. Die Röhrchen (Platten) werden gewaschen, mit BSA abgesättigt und nochmals gewaschen, wie in 1.1. beschrieben. Nun werden je 200µl der [³H]CsA-Lsg. (pro Microtiterplattenvertiefung 100µl) zugegeben und 16h bei 4°C mit den beschichteten Röhrchen inkubiert. Die radioaktive Lsg. wird aspiriert. Die Röhrchen (Platten) werden nochmals dreimal gewaschen und danach in mit 10µl Szintillationsflüssigkeit gefüllte Behälter gegeben. (Dafür werden die Vertiefungen aus den Platten herausgeschnitten). Die Radioaktivität wird gemessen, der Background mittels verschiedener un-/beschichteter und/oder nicht markierter Röhrchen (Microtiterplattenvertiefungen) bestimmt.

1.2. Double-Sandwich-ELISA: Negativwertoptimierung**Material:**

zusätzlich zu den in Kapitel III.1.2. angegebenen Reagentien

Kontrollhumanserum

Ziegen-P(ab')₂-anti-Kaninchen-IgG, peroxidasekonjugiert (Medac, Hamburg)

Ciclosporin (in pulverisierter Form; Sandoz, Basel)

Äthanol pro analysi (Merck, Darmstadt)

Anmerkung:

Statt einer beschichteten PVC-Microtiterplatte wird eine mit monoklonalem Antikörper (1:10, 1:1000), bzw. mit angereichertem Mäuseserum beschichtete Polystyrolmicrotiterplatte verwendet (siehe 1.1.1.).

1.3. Liquid phase radio assay

Ascitesproben, welche ab Tag 10 nach Inokulation von CsA-Ak-produzierenden Hybriden durch Punktion gewonnen worden sind, wurden im Radioassay (RA) auf Bindung von [³H]CsA getestet (siehe II.1.3.1.).

2. Ergebnisse

2.1. Kreuzreaktivität

Zur Abklärung der Reaktivität des mAk mit radioaktivem CsA wurden Ascitesproben, wie in Kapitel V.2.1. beschrieben, mit dem Radioassay ausgetestet. Dabei ergaben sich Bindungsquoten von 10 bis 25% für unverdünnte, nicht angereicherte Proben. In einem ähnlich gearteten Assay, dessen genaue Einzelheiten von der Firma Sandoz nicht bekanntgegeben wurden, konnte Herr Dr.J.Rosenthaler (Sandoz Ag, Basel, Schweiz) im April 1986 bestätigen, daß die Bindungsquote an tritiummarkiertes CsA für unsere Proben ca. 20% (Höchstwert 29%) betrugen. Eine Standardkurve für CsA-Konzentrationen in einem Bereich von 2-100ng/ml konnte nicht erstellt werden. Bei der Überprüfung der Reaktivität des mAk mit dem Hauptmetabolit OL-17, reagierte der mAk kreuz in einem Bereich von 200-10000ng/ml (88). Abklärungen mit weiteren Metaboliten konnten leider nicht vorgenommen werden.

2.1. Einsatzmöglichkeiten

Nachdem sichergestellt worden war, daß der mAk CsA erkennt, sollte ein Double-Sandwich-ELISA zum Nachweis von CsA in Humanserum aufgebaut werden (79). Das Prinzip der Methode ist in Abbildung 31 schematisch dargestellt. Mit mAk beschichtete Mikrotiterplatten sollten mit CsA-haltigem Human-

serum inkubiert werden, der polyklonale Kaninchen-Ak sollte zugegeben werden und die Gesamtreaktion mit einem Meerrettichperoxidase-markiertem Antikaninchen-Immunglobulin und einer Enzymsubstratreaktion visualisiert werden.

Zuerst mußte gezeigt werden, daß an PVC-Microtiterplatten der mAk gegen CsA gebunden werden kann und daß die eingesetzten Reagentien per se keine Farbentwicklung im ELISA bewirkten. Bei der folgenden Negativwertoptimierung wurden durch Variation der Konzentration und Vorbehandlung von mAk, Humanserum (HS), pAk und enzymgekoppeltem Ak sichergestellt, daß die entsprechenden Teilschritte des ELISA keine unspezifische Reaktionen auslösen. Bei einer Verdünnung von 1:10 für den mAk, 80% HS, 1:1000 für den pAk (in 2% BSA) und 1:2000 (in 2% BSA) verdünnter Peroxidase-IG-Lsg.

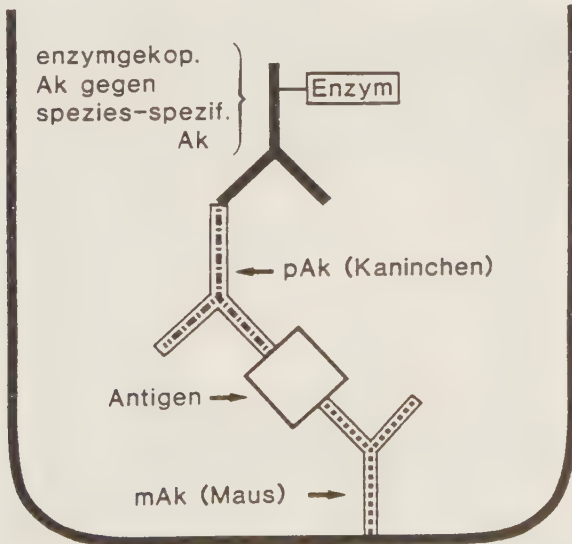


Abbildung 31:
Prinzip der Methode eines "Double-Sandwich-ELISA"

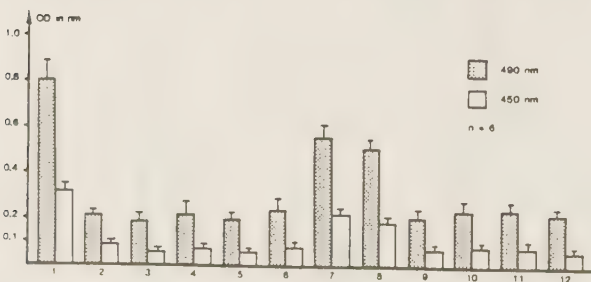
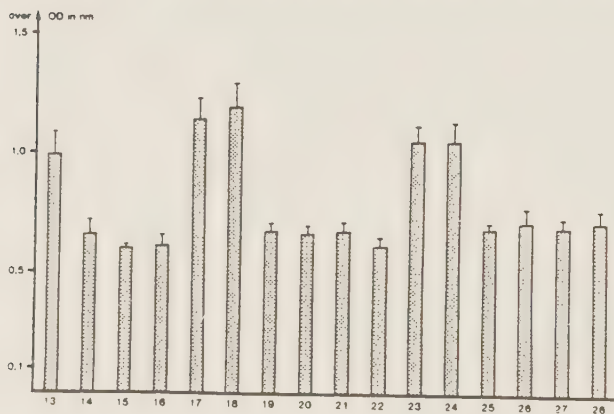
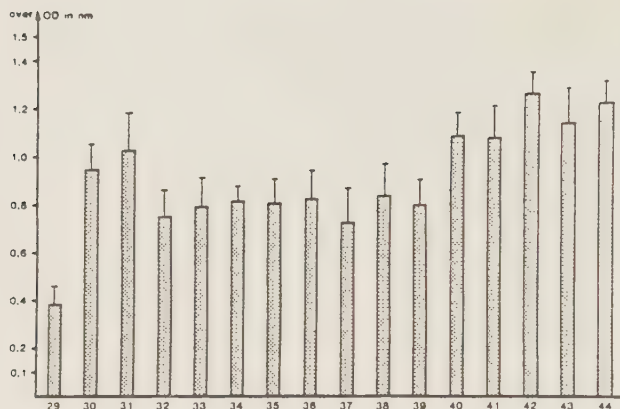


Abbildung 32:

Double-Sandwich-ELISA zur Bestimmung von Ciclosporin: Negativwertoptimierung (Kontrollen)

Erklärung der Einzelsäulen siehe Tabelle zu Abb.32

Tabelle zu Abbildung 32 (DOUBLE-SANDWICH-ELISA: Negativwertoptimierung)

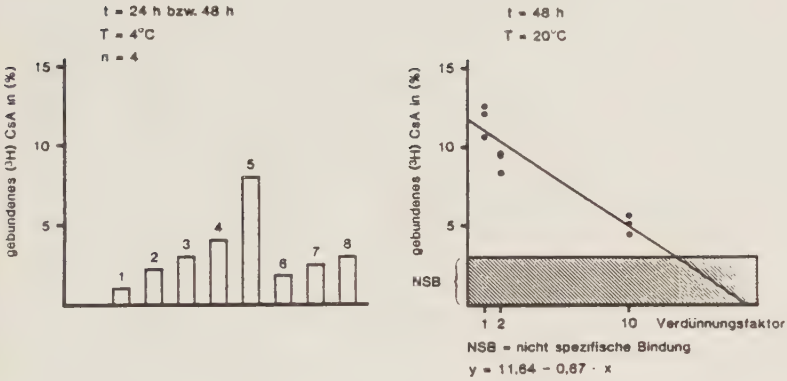
Nr	Ag-Bindung	Ak-Bindung	enzymgekoppelter AK	Messung
1	-	-	P 1:500, 2% BSA	450/490nm
2	-	-	P 1:2000, 2% BSA	450/490nm
3	-	-	P 1:2000, 2% BSA, abs.	450/490nm
4	-	-	P 1:2000, 3% BSA, abs.	450/490nm
5	-	KS 1:1000, 2% BSA	P 1:2000, 2% BSA	450/490nm
6	-	KS 1:1000, 3% BSA	P 1:2000, 3% BSA	450/490nm
7	-	KS ^a 1:1000, 2% BSA, abs.	P 1:2000, 2% BSA	450/490nm
8	-	KS ^a 1:1000, 3% BSA, abs.	P 1:2000, 3% BSA	450/490nm
9	HS 20%	KS 1:1000, 2% BSA	P 1:2000, 2% BSA	450/490nm
10	HS 20%	KS 1:1000, 3% BSA	P 1:2000, 3% BSA	450/490nm
11	HS 80%	KS 1:1000, 2% BSA	P 1:2000, 2% BSA	450/490nm
12	HS 80%	KS 1:1000, 3% BSA	P 1:2000, 3% BSA	450/490nm
13	-	-	P 1:500	450nm
14	-	-	P 1:2000	450nm
15	-	-	P 1:2000, abs.	450nm
16	-	-	P 1:2000, 2% BSA	450nm
17	-	KS 1:500	P 1:500	450nm
18	-	KS 1:1000	P 1:2000	450nm
19	-	KS 1:500	P 1:2000	450nm
20	-	KS 1:1000, 2% BSA	P 1:2000	450nm
21	-	KS 1:500, 3% BSA	P 1:2000	450nm
22	-	KS 1:1000, 3% BSA	P 1:2000	450nm
23	HS 20%	KS 1:500	P 1:500	450nm
24	HS 20%	KS 1:1000	P 1:500	450nm
25	HS 20%	KS 1:500	P 1:2000	450nm
26	HS 20%	KS 1:1000	P 1:2000	450nm
27	HS 80%	KS 1:500	P 1:2000	450nm
28	HS 80%	KS 1:1000	P 1:2000	450nm
29	-	-	P 1:2000	450nm
30	-	KS 1:500	P 1:500	450nm
31	-	KS ^a 1:500	P 1:500	450nm
32	HS 10%	KS 1:500, abs.	P 1:500	450nm
33	HS 20%	KS 1:500, abs.	P 1:500	450nm
34	HS 30%	KS 1:500, abs.	P 1:500	450nm
35	HS 40%	KS 1:500, abs.	P 1:500	450nm
36	HS 50%	KS 1:500, abs.	P 1:500	450nm
37	HS 60%	KS 1:500, abs.	P 1:500	450nm
38	HS 80%	KS 1:500, abs.	P 1:500	450nm
39	HS 100%	KS 1:500, abs.	P 1:500	450nm
40	HS 10%	KS ^a 1:500, abs.	P 1:500	450nm
41	HS 20%	KS ^a 1:500, abs.	P 1:500	450nm
42	HS 40%	KS ^a 1:500, abs.	P 1:500	450nm
43	HS 60%	KS ^a 1:500, abs.	P 1:500	450nm
44	HS 80%	KS ^a 1:500, abs.	P 1:500	450nm

Ak = Antikörper; Ag = Antigen; mAk = monoklonaler Antikörper aus ammoniumsulfat-gefälltem Ascites
 HS = Humanserum (eventuell verdünnt in PBS); KS^a = polyklonales Kaninchenserum mit Antikörper
 gegen Ciclosporin, ammoniumsulfat-gefällt; KS = polyklonales Kaninchenserum mit Antikörper gegen
 Ciclosporin, affinitätschromatographisch gereinigt; P = Ziegen-P(ab')₂-anti-Kaninchen-IgG-Antikör-
 per, (Meerrettich-)Peroxidase-konjugiert; Beschichtung: mAk 1:10;

konnte der Negativwert mit einer Extinktion von 0,244 ($\sigma = 0,028$; 490nm-Messung) bzw. 0,083 ($\sigma = 0,012$; 450nm-Messung) angegeben werden (Abb. 32, Probe 11). Mit diesem Regime wurden dann artifiziell hergestellte, CsA-haltige Proben in einer Konzentration von 250-50000 ng/ml Humanserum ausgetestet. Es konnten keine mit der CsA-Konzentration korrelierenden Extinktionsveränderungen gemessen werden. Die Negativwerte blieben ohne signifikante Änderung.

Weitere Experimente hatten zum Ziel, einen CsA-ELISA statt auf Polyvinylchlorid- auf Polystyrolplatten zu etablieren. Zwar gelang mittels mehrerer Verfahren (tritiummarkiertes CsA bzw. ELISA) der Nachweis, daß mAK gegen CsA an die Platte gebunden wird (Abb.33), jedoch lagen die Bindungsquoten mit unverdünntem mAK nur bei 2,5%. Etwas bessere Resultate brachte die Bindung von polyklonalem, CsA-Ak-haltigem Mäuseserum. Im ELISA ließen sich Verdünnungen von 1:250 gut nachweisen (Extinktion 0,926; $\sigma = 0,123$; Abb.33) und die [^3H]CsA-Bindungsquote betrug für unverdünnte Proben 12,1% (Abb.34).

Leider konnte nach erneuter Negativwertoptimierung analog zu obigen Versuchen wiederum kein CsA-ELISA erstellt werden, wobei dies weder unter Einsatz von mAK, noch mit pAK gelang.



rechte Bildseite: Probenr. 5 in verschiedenen Verdünnungen

Nr.	Röhrchen mit					
	Sz.lsg.	BSA	[3H]CsA	MAK 24h/48h	MS 24h/48h	KS 48h
1	+	-	-	-	-	-
2	+	-	+	-	-	-
3	+	+	+	-	-	-
4	+	+	+	-	-/+	-
5	+	+	+	-	+/ -	-
6	+	+	+	+/-	-	-
7	+	+	+	-/+	-	-
8	+	+	+	-	-	+

Sz.lsg. = Szintillationslösung

BSA = bovines Serumalbumin

[3H]CsA = tritiummarkiertes Ciclosporin A

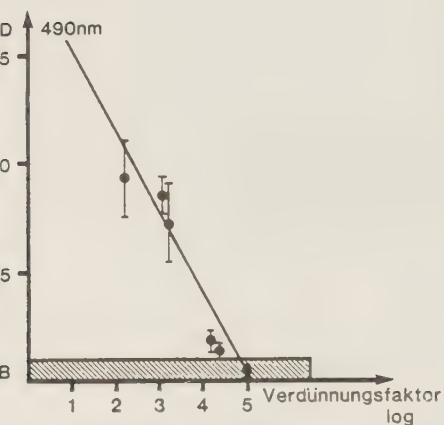
MAK = monoklonaler Antikörper aus ammoniumsulfatgefälltem Ascites (1:10)

MS = polyklonales Mäuseserum mit Antikörper gegen Ciclosporin, affinitätschromatographisch gereinigt (1:10)

KS = polyklonales Kaninchenserum mit Antikörper gegen Ciclosporin, affinitätschromatographisch gereinigt (1:2)

Abbildung 33 mit zugehöriger Tabelle:

Nachweis der Bindung von Antikörpern gegen CsA an Polystyrolröhrchen mittels [3H]CsA



NSB = nicht spezifische Bindung

$$y = 1,94 - 0,38 \cdot x$$

y_i	x_i	$x_i y_i$	x_i^2
1,103	2,4	2,647	5,76
0,885	2,4	2,124	5,76
0,860	2,4	2,064	5,76
0,857	2,4	2,057	5,76
0,860	3,1	2,666	9,61
0,774	3,1	2,399	9,61
0,923	3,1	2,861	9,61
0,897	3,1	2,781	9,61
0,815	3,4	2,771	11,56
0,785	3,4	2,669	11,56
0,475	3,4	1,615	11,56
0,797	3,4	2,710	11,56
0,146	4,4	0,642	19,36
0,179	4,4	0,788	19,36
0,189	4,4	0,832	19,36
0,201	4,4	0,884	19,36
0,140	4,7	0,658	22,09
0,164	4,7	0,771	22,09
0,153	4,7	0,719	22,09
0,107	4,7	0,503	22,09
0,063	5,0	0,315	25,0
0,043	5,0	0,240	25,0
0,044	5,0	0,220	25,0
0,046	5,0	0,230	25,0
Σ 11,51	92,0	36,17	373,52

Abbildung 34 mit zugehöriger Tabelle:

Nachweis der Bindung von Antikörpern gegen CsA an Polystyrolplatten mittels ELISA unter Verwendung von polyklonalem Mäuseserum (affinitätschromatografisch gereinigt)

3. Diskussion

Wie auch durch die Experimente von Herrn Dr.J.Rosenthaler (88) gezeigt werden konnte, handelt es sich bei dem erzeugten mAk eindeutig um einen Ak, welcher CsA als Antigen erkennt. Dieser interferiert darüberhinaus verstärkt mit dem Hauptmetaboliten OL-17. In Teil A der Arbeit wurde bereits dargelegt, daß ein Meßverfahren zur Bestimmung von CsA nicht nur das sogenannte therapeutische Fenster mit 100-800ng CsA/ml Vollblut, sondern insgesamt einen Bereich von ca.10-2000ngCsA/ml erfassen sollte. Leider reagierte der mAk nur mit dem Metaboliten in einem Bereich von 200-10000ng/ml. Wegen der geringen Affinität zu CsA ergibt sich daraus, daß der mAk zum Nachweis von CsA in Plasma oder Blutproben mittels Radioimmunoassay für den therapeutischen Bereich nicht geeignet ist, insbesondere da modifizierte radioimmunologische Techniken (85) immer sensitivere Meßbereiche angeben können. Auch ein selektiver Nachweis von OL-17 erscheint nicht möglich, auch wenn die Affinität zu diesem Antigen größer ist. Andererseits sind für die isolierte Messung von CsA-Metaboliten mittels HPLC erfolgreiche Wege beschritten worden (63). Beachtet werden sollte dabei, daß die Affinität zu einem Antigen stark von der Reinheit des Ak abhängt (32,93) und unsere Proben als Ascites oder ammoniumsulfatgefällter Ascites ausgetestet worden waren, so daß optimal aufbereitete Ak günstigere Resultate erbringen könnten.

Eine andere Frage ist, der Einsatz von mAk in enzymimmuno-

gischen Verfahren zum Nachweis von CsA. Leider haben unsere Studien bisher die Bestimmung von CsA mittels Double-Sandwich-ELISA nicht demonstrieren können. Bei einer Doppelantikörperbestimmung spielt der Epitopangriffsort des einzelnen Ak sowie die Immunglobulinklasse mit ihrer sterischen Struktur eine wichtige Rolle (46). Da es sich um einen monoklonalen IgM-Ak mit einem MG von ca. 900000 handelt, der ein Antigen mit MG von 1202 binden soll, wäre es durchaus möglich, daß diese Konstellation andere Epitopangriffspunkte für einen zweiten Ak (welcher Ig-Klasse auch immer) verdeckt. Andererseits haben unsere Studien (wie auch Studien der Firma SANDOZ) in einem Doppelantikörperregimen mit zweierlei pAk von unterschiedlicher Spezies im ELISA ebenfalls nicht zum Erfolg geführt, während von BEISSWINGER eine Studie zur Doppelantikörperbestimmung im Radioimmunoassay vorliegt (7). In diese Überlegungen muß auch die Frage nach der Verteilung von CsA im Serum (96) bzw. die Bindung an Lipoproteine (77) einbezogen werden. Eine Antigenmaskierung kann nicht ausgeschlossen werden.

Während dieser Fragenkomplex nur durch genaue Epitopstudien eindeutig beantwortet werden kann, scheint auf die Frage, warum der Double-Sandwich-ELISA unter Einsatz von Polyvinylchloridmicrotiterplatten undurchführbar ist, eine Antwort möglich. In Kapitel IV. wurde die Erkennung von PVC-Strukturen als Antigen für CsA-Ak diskutiert. Unter einer solchen Prämisse ließe sich auch mit anderen enzymologischen Nachweistechiken wie z.B. in einem Avidin-Biotin-System (36) kein leistungsfähiger Assay erstellen. Daß die ELISA-

Technik auch mit Polystyrolplatten scheiterte, könnte mit der bekanntermaßen wesentlich niedrigeren Ak-Bindungsquote erklärbar sein. Analoge Versuche mit modifizierten Microtiterplatten (z.B. Immunobond-system[®], Immutech) stehen noch aus.

Auch wenn bisher Versuche zur Etablierung automatisierbarer, einfacher und nicht radioaktiver Assays für die Bestimmung von CsA und/oder seiner Metaboliten nicht gelungen sind, so wird dennoch in absehbarer Zeit durch die Einführung mAk mit unterschiedlichsten Antigenangriffspunkten zumindest der Radioimmunoassay differenziertere Aussagen über CsA-Spiegel liefern können.

Teil C:

Zusammenfassung

ZUSAMMENFASSUNG

Cyclosporin A (CsA), ein neutrales, äußerst lipophiles Undecapeptid, spielt in der Transplantationsmedizin eine wichtige Rolle zur Verhinderung der Organabstoßung. Weil CsA u.a. dosisabhängig nephrotoxische Nebenwirkungen hervorruft und diese zusätzlich von einer Anzahl interindividueller Faktoren abhängen, kommt der Bestimmung von CsA-Serum/Blutspiegeln eine große Bedeutung zu. Zur Zeit sind für die Messung von CsA der Radioimmunoassay (RIA) und die High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC) geeignet. Beide Methoden weisen entscheidende Nachteile auf. Im RIA wird derzeit ein Antiserum mit polyklonalen Antikörpern (Ak) gegen CsA eingesetzt und damit dann nicht nur CsA, sondern auch einige Metaboliten der Muttersubstanz bestimmt. Die HPLC ist nur für kleine Probenanzahlen geeignet. Wünschenswert wäre ein automatisierbares, nicht radioaktives Verfahren wie es der Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA) darstellt, wobei eine Differenzierung zwischen CsA und Metaboliten möglich sein sollte. Dazu bedarf es der Herstellung monospezifischer, d.h. monoklonaler Antikörper (mAk). Die Präparation mAk gegen CsA scheiterte bisher an der Tatsache, daß 1. CsA per se nicht antigen wirksam zu sein scheint, 2. CsA mit großmolekularen Proteinen nicht koppelbar ist, 3. CsC, welches sich von CsA in einer Aminosäure unterscheidet, als Peptidcarriergekoppeltes CsC nur niedrige Antikörpertiter gegen CsA hervorrief und 4. keinerlei Methoden zur Bestimmung von CsA-Ak-Titern publiziert waren. In der vor-

liegenden Arbeit wird über eine verbesserte Methode zur Kopplung von CsC an Protein berichtet, mit deren Hilfe hochtitrige Antiseren bei Kaninchen und Maus mit polyklonalen Ak gegen CsA hergestellt werden konnten. Es wird ein Radioassay beschrieben, mit welchem es möglich ist, CsA-Ak-Titer zu bestimmen. Zur Messung von CsA-Ak in ng-Konzentrationen, wie sie in Zellkulturüberständen vorliegen, wurde ein ELISA entwickelt. Unter Einsatz dieser Methoden konnte ein mAk gegen CsA hergestellt werden, dessen Eignung in verschiedenen Assays zur Bestimmung von CsA überprüft wurde.

Teil D:

Verzeichnisse

- I. Verzeichnis der Abkürzungen
- II. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Tafeln
- III. Literaturverzeichnis
 - 1. alphabetisches Literaturverzeichnis
 - 2. themenorientiertes Literaturverzeichnis

I. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABTS	Azino-diäthyl-benzthiazolin-sulfat
Abu	α -Aminobuttersäure
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BSA	Bovines Serum Albumin
CFA	complete Freund'sches Adjuvans
CsA	Cyclosporin A = Ciclosporin
CsC	Cyclosporin C
dATP	Adenosintriphosphat
dNTP	Nukleotidtriphosphate
DMEM	Dulbecco's modified Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECDI	Ethylencarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	Fetales Calf Serum
h	Stunde
HAT	Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
HT	Hypoxanthin/Thymidin
HS	Humanserum
Ig	Immunglobulin
i.p.	intraperitoneal
LAF	Lymphocyte activating factor
mAk	monoklonaler Antikörper
MG	Molekulargewicht
MeBmt	4(R)-4-[(E)-2-butenyl]-4,N-dimethyl-L-threonin
NSB	nicht spezifische Bindung
NTE	NaCl/Tris/EDTA
OPD	Orthophenyldiamin
pAk	polyklonale Antikörper
PBS	Phosphat buffered saline
PVC	Polyvinylchlorid
RA	Radioassay
RIA	Radioimmunoassay
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SSC	Sodiumchloridsodiumcitrat
TCGF	T-cell growth factor
TE	Tris/EDTA
Tab.	Tabelle
Thr	Threonin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitan

II. Verzeichnis der Abbildungen, Tabellen und Tafeln

- Abbildung 1: Strukturformel von Ciclosporin (CsA)
- Abbildung 2: Fachliteratur zum Thema Ciclosporine
- Abbildung 3: Flußdiagramm: Entwicklung eines monoklonalen Antikörpers (mAk) gegen CsA
- Abbildung 4: Prinzip der Methode zum Nachweis von CsA-Ak mit [^3H]CsA (Radioassay)
- Abbildung 5: Nachweis spezifischer Ak gegen CsA bei der Maus mittels Radioassay (Konjugatherstellung nach Methode 1)
- Abbildung 6: Nachweis spezifischer Ak gegen CsA bei der Maus mittels Radioassay (Konjugatherstellung nach Methode 2)
- Abbildung 7: Nachweis spezifischer Ak gegen CsA beim Kaninchen mittels Radioassay (Konjugatherstellung nach Methode 2)
- Abbildung 8: Nachweis der Sekretion von Immunglobulinen bzw. deren Bestandteilen (leichte, schwere Kette) mittels Autoradiogramm
- Abbildung 9a und 9b: Autoradiogramme zum Nachweis von leichten und schweren Ketten
- Abbildung 10: Fusion von Myelomzellen und Lymphozyten
- Abbildung 11: Selektion von NSO-Lymphozyten-Hybridoma mittels HAT-Medium
- Abbildung 12: Synthesewege der Purine
- Abbildung 13: Prinzip der Methode zum Nachweis von monoklonalen Antikörpern mittels Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA)
- Abbildung 14 und 15: Einfluß verschiedener Behandlungstechniken auf die Bindung von CsA/[^3H]CsA an PVC-Microtiterplatten
- Abbildung 16: Nachweis von Antikörpern gegen CsA mittels ELISA (Kontrollen)
- Abbildung 17: Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA mittels ELISA
- Abbildung 18: Selektion von Hybridoma mit stabiler Produktion von CsA-Antikörpern mittels Limiting dilution für den Klon 1B3D5B5C9C11R6H12 (ELISA)
- Abbildung 19: Einfluß verschiedener Faktoren auf den Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA mittels ELISA: Einfluß der Zugabe von Albumin zu spezifischem Antikörper
- Abbildung 20: Einfluß verschiedener Faktoren auf den Nachweis von monoklonalen Antikörpern gegen CsA mittels ELISA: Einfluß verschiedener Puffer
- Abbildung 21: Nachweis von mAk gegen CsA in Ascites mittels [^3H]CsA (Radioassay)
- Abbildung 22: Nachweis von mAk gegen CsA in Ascites mittels ELISA
- Abbildung 23: Nachweis von mAk gegen CsA in ammoniumsulfatgefälltem Ascites mittels ELISA
- Abbildung 24: Proteinelektrophorese von Ascites und ammoniumsulfatgefälltem Ascites
- Abbildung 25: Nachweis von poly- und monoklonalen Antikörpern gegen CsA in Ascites und Serum mittels ELISA
- Abbildung 26: Protein A-Sepharose-Affinitätschromatographie von Kaninchenserum mit polyklonalen Antikörpern gegen CsA
- Abbildung 27: Nachweis von Antikörpern gegen CsA mittels [^3H]CsA (Radioassay) in affinitätschromatographisch aufbereitetem Kaninchenserum (verschiedene Eluatfraktionen)
- Abbildung 28: Nachweis von Antikörpern gegen CsA mittels [^3H]CsA (Radioassay) in affinitätschromatographisch aufbereitetem Kaninchenserum
- Abbildung 29 und 30: Bestimmung der Immunglobulinsubklasse des monoklonalen Antikörpers gegen CsA mittels Immunelektrophorese und Ouchterlony-Immundiffusion
- Abbildung 31: Prinzip der Methode eines "Double-Sandwich-ELISA"
- Abbildung 32: Doublesandwich-ELISA zur Bestimmung von Ciclosporin: Negativwertoptimierung (Kontrollen)
- Abbildung 33: Nachweis der Bindung von Ak gegen CsA an Polystyrolröhrchen mittels [^3H]CsA
- Abbildung 34: Nachweis der Bindung von Ak gegen CsA an Polystyrolplatten mittels ELISA unter Verwendung von polyklonalem Mäuseserum
- Tabelle 1: Entwicklung von Ciclosporin
- Tabelle 2: Nebenwirkungen von Ciclosporin
- Tabelle 3: Faktoren für die interindividuelle Variabilität von Ciclosporin-Spiegeln
- Tabelle 4: Faktoren für die Vergleichbarkeit von CsA-Spiegeln

Tabelle 5: Gegenüberstellung der Methoden zur Bestimmung von Ciclosporin

Tabelle 6: Anwendungsmöglichkeiten für monoklonale Antikörper

Tabelle 7: Einfluß verschiedener Behandlungsverfahren von PVC-Microtiterplatten auf die Bestimmung von Ciclosporin-Antikörpern

Wertetabelle zu Abbildung 32

Wertetabelle zu Abbildung 33

Wertetabelle zu Abbildung 34

Tafel 1: Dargestellt sind Hybridzellen, welche 14 Tage nach Fusion aufgenommen wurden. Die Klone sind umgeben von Massen bereits abgestorbener NS0-Zellen bzw. Lymphozyten.

Tafel 2: Abgebildet ist ein Zellklon, der aus einer Mikrokultur heraus fotografiert wurde (8 Tage nach Limiting dilution). In der Vergrößerung ist ein Ausschnitt aus obigem Zellklon zu sehen (große Zellen: Hybridzellen, kleine Zellen: Lymphozyten, Feederzellen).

Tafel 3: Aufgenommen ist ein Ausschnitt aus einem Ascitesausstrichpräparat (nach Pappenheim gefärbt). Der Ascites wurde 10 Tage nach Hybridinokulation durch Punktion gewonnen. Bei den großen blaugefärbten Zellen handelt es sich um die injizierten Hybridzellen, die rosafarbenen Gebilde stellen ausgetretene Kernsubstanzen dar und bei den eher farblosen Zellen handelt es sich um mauseigene Lymphozyten.

III. Literaturverzeichnis

1. alphabetisches Literaturverzeichnis

- 1) Albano et al (1984), How to measure Cyclosporine, The Lancet 18:408-409
- 2) Andersson O. et al (1976), Schätzen und Testen, Springer Verlag, Berlin
- 3) Andrus L./Lafferty K.J. (1982), Inhibition of T-cell activity by Cyclosporin A, Scand J Immunol 15:449-458
- 4) Arquebourg P.C. (1975), Immunelectrophoresis, 2.Auflage, S.Karger, Basel
- 5) Az W. (1980), Monoklonale Antikörper durch Lymphozyten-Hybridisierung, Laboratoriumsblätter 30:89-100
- 6) Bastin J.M. et al (1982), Production of monoclonal antibodies: a practical guide, in Monoclonal antibodies in clinical medicine, McMichael A.J./Fabre J.W. (Hrsg.), Academic Press, London
- 7) Beisswinger S. (1984), Die Entwicklung eines Doppel-Antikörper-Radioimmunoassay für Cyclosporin A und klinische Verlaufsuntersuchungen zu Nebenwirkungen des Cyclosporin A bei Patienten nach Nierentransplantationen, Diss., 113 Weinsberg (BRD)
- 8) Bleyüller J. et al (1979), Statistik, Franz Vahlen Verlag, München
- 9) Borel J.-P. (1986), 2.Bannoversches Cyclosporin Symposium
- 10) Brando B. et al (1985), Effects of Cyclosporine on Lymphocyte surface Activation, Markers and Cell Cycle, Transpl Proc Vol XVII No6:2709-2711
- 11) Britton S./Palacios R. (1982), Cyclosporin A: Usefulness, Risks and Mechanism of Action, Immunolog Rev Vol 65:5-22
- 12) Brooks T.L./Stevens A. (1985), Preparative HPLC Purification of IgG and IgM Monoclonal Antibodies, American Laboratory 10:
- 13) Bunjes D. et al (1981), Cyclosporin A mediates immunosuppression of primary cytotoxic T cell responses by impairing the release of interleukin 1 and 2, Eur J Immunol Vol 11:657-661
- 14) Campbell D.H. et al. (Hrsg., 1970), Methods in Immunology, W.A.Benjamin, Reading, Massachusetts
- 15) Chang T.H. et al. (1980), Production of monoclonal antibodies in serum free medium, J Immunol Meth 39:369-375
- 16) Claflin L./Williams K. (1978), Mouse myeloma - spleen cell hybrids: Enhanced hybridisation frequencies and rapid screening procedures, in Current topics in microbiology and immunology: Lymphocyte hybridomas, Hrsg.: Melcher F., Potter M., Warner M.L., Springer-Verlag, New York
- 17) Diamond B.A. et al (1981), Monoclonal antibodies, New Eng J Med 304,22:1344-1349
- 18) Dowday E. et al (1984),ariat Structures are in vivo intermediates in Yeast Pre-mRNA Splicing, Cell Vol39:611-621
- 19) Donatsch P. et al. (1981), A radioimmunoassay to measure Cyclosporin A in plasma and serum samples, J Immunoassay 2/1:19-32
- 20) Eisenbarth G. (1981), Application of monoclonal antibody techniques to biochemical Research, Anal Biochem 11:1-16
- 21) Elton R.A./Mc Bride W.H. (1978), Statistical aspects of planning and design of immunological experiments, in Handbook of Experimental Immunology, Weir D.M. (Hrsg.), Blackwell, Oxford
- 22) Emrich P./Meuer S. (1985), Human T-cell clones find ever wider application, Immunology today 3:197-199
- 23) Emrich P. (1985), Monoklonale Antikörper: Biotechnologie für jedermann?, Klinikarzt 14:374-375
- 24) Engvall E./Pesce A.J. (1978), Quantitative Enzyme Immunoassay, Scand J Immunol No8 Suppl 7
- 25) Engvall E./Perlman P. (1971), Enzyme-linked immunosorbent Assay (ELISA), Immunochem 8:871-874
- 26) Engvall E./Perlman P. (1972), Enzyme-linked immunosorbent Assay, ELISA, J Immunol 109:129-135
- 27) Ernst M. (1985), Monoklonale Antikörper, mta 11/12, Umschau Verlag
- 28) Ernst M. (1984), Monoklonale Antikörper und ihr diagnostischer Wert, Diagnostik 17:11-15
- 29) Eshhar Z. (1980), Protocol for the production of hybridomas secreting monoclonal antibodies, Laboratory manual, Feinberg Graduate School, Rehovot, Israel
- 30) Ey P.L. et al (1978), Isolation of pure IgG₁, IgG_{2a} and IgG_{2b} Immunoglobulins from Mouseserum Using Protein A, Immunochemistry 15:429-436

- 31) Priemel H. (Hrsg., 1984), *Immunologische Arbeitsmethoden*, G.Fischer Verlag, Stuttgart
- 32) Gfeller J.C. et al (1980), Erhöhung der Nachweismempfindlichkeit von Cyclosporin A durch Derivatisierung mit 2-Naphtylselenenylchlorid, *Helv chim Acta* 63:728-732
- 33) Goding J.W. (1980), Antibody production by hybridomas, *J Immunol Meth* 39:285-308
- 34) Graffenried, von B./Krupp P. (1985), Nebenwirkungen von Cyclosporin nach Nierentransplantationen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, *Internist* 26:542-548
- 35) Griswold W.R./ Nelson D.P. (1984), A rapid method for the determination of antibody affinity, *Immunol Letters* 7:229-232
- 36) Guesdon J.-L. et al (1979), The Use of Avidin-Biotin Interaction in Immunoenzymatic Techniques, *J Histochem Cytochem* 27:1131-1139
- 37) Gulden van der W.J.I. et al (1980), Versuchstierhaltung und Versuchstiertechniken, Gesellschaft für Versuchstierkunde, Hannover
- 38) Heide K./Schwick H.G. (1979), Saltfraction of Immunoglobulins, in *Handbook of Experimental Immunology*, Hrsg. Weir D.M.; 3.Auflage, Blackwell, Oxford
- 39) Heinz F.X. (1985), Monoklonale Antikörper in der Virologie, *Wiener klin Wochenschr* 97/5:231-237
- 40) Hengartner H. et al (1978), Fusion of in vitro immunized lymphoid cells with X63Ag8, in *Current topics in microbiology and immunology: Lymphocyte hybridomas*, Hrsg.: Melcher F., Potter M., Warner N.L., Springer-Verlag New York
- 41) Herzenberg L.A./Herzenberg L.A. (1978), Mouse immunoglobulin allotypes: Description and specific methodology, in *Handbook of Experimental immunology*, Weir D.M. (Hrsg.), Blackwell Oxford
- 42) Hiestand P.C. et al (1985), The immunosuppressive profile of a New Natural Cyclosporine Analogue: Mva2-Cyclosporine, *Transpl Proc Vol XVII* No1:1362-1364
- 43) Hjelm H. et al (1972), Protein A from *Staphylococcus aureus*. Its Isolation by Affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins, *FEBS Lett* 28:73-76
- 44) Book I.B./Smith J.H. (1985), Biochemical Mechanism of Nephrotoxicity, *Transpl Proc Vol XVII* No4 Suppl 1:41-48
- 45) Hopp T.P. (1986), Protein surface analysis: Methods for identifying antigenic determinants and other interaction sites, *J Immunol Methods* 88:1-18
- 46) Jäger L. (1983), *Klinische Immunologie*, Gustav Fischer Verlag Stuttgart
- 47) Jarvis A.P. et al (1983), Production of biologicals from microencapsulated living cells, *Bio Techniques* 3/4
- 48) Juarez-Salinas R. et al (1984), Ultrapurification of Monoclonal Antibodies by Hydroxylapatite (HAPT) Chromatography, *Bio Techniques* 2, 164
- 49) Köhler G./Milstein C. (1975), Continuous cultures of fused cells secreting antibody of pre-defined specificity, *Nature* 256: 495-497
- 50) Köhler G./Milstein C. (1976), Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, *Eur.J.Immunol* 6:511-519
- 51) Köhler G. et al (1976), Fusion between immunoglobulin-secreting and non-secreting myeloma cell lines, *Eur J Immunol* 6:292-295
- 52) Köhler G. et al (1976), Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion, *Eur J Immunol* 6:511-519
- 53) Kahan B.D. (1985), Cyclosporine: The Agent and its Actions, *Transpl Proc Vol XVII* No4 Suppl 1:5-18
- 54) Kaufmann S.H.Z. (1983), Monoklonale Antikörper und ihre Anwendungsmöglichkeiten in der Medizin, *Immun Infekt.* 11:23-29
- 55) Kennett R.H. (1979), Monoclonal antibodies: hybrid myelomas - a revolution in Serology and Immunogenetics, *Am J Hum Gen* 31:539-547
- 56) Kennett et al. (1978), Hybrid plasmacytoma production: Fusion with adult spleen cells, monoclonal spleen fragments, neonatal spleen cells and human spleen cells, in *Current topics in microbiology and immunology: Lymphocyte hybridomas*, Hrsg.: Melchers F., Potter M., Warner N.L., Springer-Verlag, New York
- 57) Keown P.A. et al (1983), The clinical Relevance of Cyclosporine Blood Levels as Measured by Radioimmunoassay, *Transpl Proc Vol XV* No 4 Suppl 1:2438-2441

- 58) Klein J. (1982), *Immunologie*, Wiley, New York
- 59) Knapp W. (1985), Monoklonale Antikörper in der klinischen Medizin, *Wiener klin Wochensh* 97/5: 229-230
- 60) Knapp W. et al. (1985), Überlegungen zur therapeutischen Anwendung monoklonaler Antikörper, *Wiener klin Wochensh* 97/3:97-107
- 61) Krakauer H. (1985), Clinical applications of monoclonal antibodies, *Eur J Clin Microbiol Vol* 4,1:1-9
- 62) Lacy M.J./Voss E.W. (1986), A modified method to induce immune polyclonal ascites fluid in Balb/c mice using Sp2/0-Ag-14 cells, *J Immunol Methods* 87:169-177
- 63) Lensmeyer G.L. et al (1985), Improved liquid chromatographic determination of cyclosporine, with concomitant detection of cell-bound metabolites, *Clin Chem* 31:196-201
- 64) Lenz D.E. (1976), Antibody quantitation using an immunoabsorbent and the unlabeled antibody enzyme method, *J Immunol Meth* 13:113-123
- 65) Littlefield J.M. (1964), Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants, *Science* 145:709-710
- 66) Lokiec T. et al (1983), Pharmacologic Monitoring in the Clinical Use of Cyclosporins, *Transpl Proc Vol XV No 4 Suppl 1:2442-2445*
- 67) Loosli H.-R. et al (1985), Cyclosporin A: The Confirmation in the Crystal and in Solution, *Helv Chim Acta* 68:682-704
- 68) La France N.D. et al. (1985), Diagnostische Anwendung monoklonaler Antikörper, *DMW* 110/16:651-653
- 69) Male D./Pryce G. (1983), A rapid assay for immunoglobulin in Hybridoma supernatants, *Immunol Comm Vol 12 No5:465-471*
- 70) Maniatis T. (1982), *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbour
- 71) Maurer G. (1985), Metabolism of Cyclosporine, *Transpl Proc Vol XVII No4 Suppl 1:19-26*
- 72) McKearn T.J. et al (1980), Binding Hybridoma Antibodies to Polyvinylchlorid Microtiter Dishes, in *Monoclonal Antibodies*, Hrsg.: Kennett R.H., McKearn T.J., Bechtol K.B., Plenum Press, New York
- 73) McKearn et al (1978), Selectiv suppression of reactivity to rat histocompatibility antigens by hybridoma antibodies, in *Current topics in microbiology and immunology: Lymphocyte hybridomas*, Hrsg.: Melchers P., Potter M., Warner N.L., Springer-Verlag, New York
- 74) Melchers P. et al (1978), *Current topics in microbiology and immunology : Lymphocyte Hybridomas*, Melchers P., Potter M., Warner N.L., Springer-Verlag New York
- 75) Milstein C. (1980), Monoklonale Antikörper, *Spektrum der Wissenschaft* 12:97-108
- 76) Milstein C. (1980), Monoclonal antibodies, *Scientific American* 243:56-64
- 77) Mraz W. et al (1986), Cyclosporin A in human blood. The role of lipoproteins in binding and transfer of the drug, Abstract, 2.Hannoversches Cyclosporin Symposium 1986
- 78) Mueller D. et al (1986), Monoclonal antibody production by hybridoma growth in Freund's adjuvans primed mice, *J Immunol Methods* 87:193-196
- 79) Nakamura R.M. et al (Hrsg.,1979), *Immunoassay in the clinical Laboratory*, Alan R.Liss Inc., New York
- 80) Ouchterlony Ö./Nilsson U.A. (1978), Immundiffusion and immunoelectrophoresis in *Handbook of experimental Immunology*, Weir D.M. (Hrsg.), Blackwell, Oxford
- 81) Oi V. T./Herzenberg U.A. (1980), Immunoglobulin-producing hybrid cell lines, in *Selected methods in cellular immunology*, Hrsg.: Mishell B.B./Shigi S.M., W.H.Freeman Comp., San Francisco
- 82) Preud'homme J.K. et al (1975), *Proc Natl Academic Sci USA* 72:1427
- 83) Quesniaux V. et al. (1985), An Enzyme Immunoassay for the Screening of Monoclonal Antibodies to Cyclosporin, *Immunol Letters* 9:99-104
- 84) Röllinghoff W. (1983), Interleukine: Signalstoffe der Immunabwehr, *Die gelben Hefte* 23:129-134
- 85) Randall G./Jacobs P. (1985), Cyclosporin A radioimmunoassay: a modified method for whole blood determination, *Exp Hematol* 13:874-878
- 86) Reis G.A.D./Shevach E.M. (1982), Effect of Cyclosporin A on the T-cell function in vitro: The mechanism of suppression of T-cell-Proliferation depends on the nature of the T-cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T-cell, *J Immunology Vol* 129,6:2360

- 87) Robinson W.T. (1985), Methods to Measure Cyclosporine Levels - High Pressure Liquid Chromatography, Radioimmunoassay and Correlation, Transpl Proc Vol XV No 4 Suppl 1:2403-2408
- 88) Rosenthaler J. (1986), persönliche Korrespondenz
- 89) Ryffel B. et al (1982), Cyclosporin receptors on human lymphocytes, J Immunology Vol 129, 5:1978-1982
- 90) Schlüsener H.J. et al (1981), Evaluation of alternative screening and selection procedures in hybridoma technology, in Protides of the biological fluids, Hrsg. Peeters H., Pergamon Press Oxford
- 91) Schneider J. (1985), Tumormarker in der Diagnostik maligner Prozesse, Diagnostik 18,1:25-31
- 92) Schulman M. et al. (1978), A better cell line for making Hybridomas Secreting Specific Antibodies, Nature 276:269-270
- 93) Shields J.G./M.W.Turner (1986), The importance of antibody quality in sandwich ELISA systems, J Immunol Methods 87: 29-33
- 94) Shobara Vora (1985), Monoclonal antibodies in enzyme research: Present and potential applications, Anal Biochem 144:307-318
- 95) Sjögren-Jansson E./Jeansson S. (1985), Large-scale Production of Monoclonal Antibodies in Dialysis Tubing, J Immunol Methods 84:359-364
- 96) Smith J.M. et al (1983), Stability of cyclosporin A in human serum, J clin Path 36:41-43
- 97) Specht von B.D. (1982), Koppelung von Medikamenten an Trägersubstanzen, Münch med Wschr 124:932-934
- 98) Spees E.K. et al (1985), The current Experience with Cyclosporine in the United States: Living related Kidney Transplant Recipients, Transpl Proc Vol XVII No6:2657-2659
- 99) Spees E.K. et al (1985), The current Experience with Cyclosporine in the United States: Cadaver Kidney Transplantation, Transpl Proc Vol XVII No6:2260-2262
- 100) Spira G. et al (1984), The identification of monoclonal class switch variants by sib selection and an ELISA Assay, J Immunol Meth 74:307-315
- 101) Stalla G.K. (1981), The development of a homologous Radioimmunoassay for serum cortisol, J Clin Chem Clin Biochem Vol 19:427-434
- 102) Steffen C. (1968), Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 103) Steward M.W./Lew A.M. (1985), The Importance of affinity in the performance of immunoassays for antibody, J Immunol Meth 78(2):173-190
- 104) Stocker J.W. (1981), Enzyme Immunoassay for the Detection of Hybridoma Products, Immunol Meth Vol 2:2299-308
- 105) Strauß W. (1979), Peroxidase procedures, J Histochem Cytochem 27:1349-1351
- 106) Traber R. et al. (1977), Neue Cyclopeptide aus Trichoderma polysporum, Helv Chim Acta 60:1568-1678
- 107) Traber R. et al. (1977), Die Struktur von Cyclosporin C, Helv Chim Acta 60:1247-1255
- 108) Vindimian M./Wattre P. (1984), A rapid quantitative Determination of low concentrations of IgG using ¹²⁵I labelled Protein A, Path Biol Vol 32 No10:1051-1054
- 109) Vorlaender K.-O. (Hrsg., 1983), Immunologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- 110) Wagner H. et al (1985), Wirkungsmechanismus des Cyclosporin A, Internist 26:530-533
- 111) Walter G. (1986), Produktion of antibodies against synthetic peptides, J Immunol Methods 88:149-161
- 112) Weir D.M. (1979), Handbook of Experimental Immunology, 3.Auflage, Blackwell, Oxford
- 113) Wenger R. (1983), Synthesis of Cyclosporine and Analogues: Structure, Activity, Relationships of the New Cyclosporine Derivatives, Transpl Proc Vol XV No4 Suppl 1:2230-2241
- 114) Wenger R. (1984), Total synthesis - change in molecular structure - biological effect: Cyclosporin as example, Sandorama III, Basel
- 115) Wenger R. (1985), Synthese von Cyclosporin und Analoga: Zusammenhang zwischen Struktur und immunsuppressiver Aktivität, Angewandte Chemie 2:88-96
- 116) Whiting P.H. et al (1985), Cyclosporine: Toxicity, Metabolism and Druginteractions - Implications from animal studies, Transpl Proc Vol XVII No 4 Suppl 1:134-144
- 117) Wiesinger D./Borel J.P. (1979), Studies of the mechanism of action of Cyclosporin A, Immunobiol Vol 156:454-463
- 118) Williams C.A./Chase M.W. (Hrsg., 1967), Methods in Immunology and Immunchemistry, Academic

Press, New York

- 119) Wiscott E. (1983), Sandimmun® - Prototyp einer neuen Generation von Immunsuppressiva, Sandoz Bulletin 65, Basel
- 120) Woloszczuk W. et al. (1984), How to measure Ciclosporin, The Lancet 15:638
- 121) Monigeit K. (1985), Pharmakokinetik von Cyclosporin A und Bedeutung der Blutspiegelmessung für die Therapie, Internist 26:534-542
- 122) Wood A.J./Lemaire M. (1985), Pharmacologic Aspects of Cyclosporine Therapy: Pharmacokinetics, Transpl Proc Vol XVII No4 Suppl 1:27-32
- 123) Wood A.J. et al (1983), Cyclosporine: Pharmacokinetics, Metabolism and Drug Interaction, Transpl Proc Vol XV No4 Suppl 1:2409-2412
- 124) Yatscoff R.W. et al (1984), Effects of Sample Preparation on Concentration of Cyclosporin A measured, Clin Chemistry Vol 30 No 11:1812-1814
- 125) Yelton D.E. et al (1981), Plasmacytomas and Hybridomas: Development and applications, in Monoclonal antibodies, Hybridomas: A new dimension in biological analysis, Hrsg.: Kennett R.E., McKearn T., Bechtol K.B.
- 126) Yelton D.E. et al (1978), Fusion of Mouse myeloma and spleen cells, in Current topics in microbiology and immunology: Lymphocyte hybridomas, Hrsg.: Melchers F., Potter M., Warner H.L., Springer-Verlag, New York

2. Themenorientiertes Literaturverzeichnis

zu Teil A:

Nr.1,9,11,13,15,19,34,42,44,53,57,66,67,71,84,86,87,89,98,99,110,113,114,115,116,117,119,120,121,
122,123;

zu Teil B:

Kapitel I.: Nr.20,22,23,27,28,39,49,50,54,59,60,61,68,91,92,111;

Kapitel II.: Nr.19,31,83,97,101,106,107,112;

Kapitel III.: Nr.5,6,16,18,29,33,51,52,56,65,70,73,81,92,126;

Kapitel IV.: Nr.15,17,24,25,26,31,64,69,72,74,75,76,83,90,104,105,108,109,125;

Kapitel V.: Nr.5,9,12,14,30,33,38,43,47,48,55,62,78,95,102,104,118;

Kapitel VI.: Nr.4,35,41,45,58,80,100,103,110;

Kapitel VII.: Nr.7,32,36,46,63,77,79,85,88,93,96;

zu Appendix:

Nr.2,8,21,37;

Appendix:

1. Nomenklatur
2. Anmerkungen zu statistischen Methoden
 - 2.1. Varianz
 - 2.2. Regressionsanalyse
 - 2.3. T-Test
3. Tierhaltung
 - 3.1. Mäuse
 - 3.2. Kaninchen

1.Nomenklatur

Das unter dem Namen "Cyclosporin A" bekannte cyclische Unde-
capeptid wurde aus praktischen Gründen zu "Cyclosporin".
Nachdem in den USA die Bezeichnung "cyclosporine" (USAN),
im sonstigen englischsprachigen Bereich der Begriff "cyclo-
sporin" (BAN), im französischen Schrifttum "ciclosporine"
verwendet wird, wird in dieser Arbeit gemäß der I.N.N. der
WHO verfahren und der Name "Ciclosporin bzw. Ciclosporine
(Plural)" angegeben. Soll der Unterschied verschiedener
Ciclosporin-Analoga deutlich werden, wird "Cyclosporin A,
Cyclosporin C etc." benutzt. Entsprechend werden auch die
Begriffe mit "CsA" für "Cyclosporin A" und "CsC" für "Cyclo-
sporin C" abgekürzt.

2. Anmerkungen zu statistischen Methoden

2.1. Varianz

Der Stichprobenumfang war immer größer als vier. Die Varianz wurde nach dem Verschiebungssatz berechnet (Formel A, siehe Kasten). Die Standardabweichung ergibt sich aus $\sigma = \sqrt{s^2}$.

2.2. Regressionsanalyse

Zur Berechnung der Regressionsgeraden wurde die Methode der kleinsten Fehlerquadratsumme verwendet. Die Berechnung der Gerade $Y = a_0 + a_1 \cdot x$, wobei a_0 die Affinitätskonstante und a_1 die Steigung darstellt, erfolgte mit den Formeln B und C (siehe Kasten). Dabei ist x die variable Variable, y die empirisch erfaßte Variable, $\bar{x}$ bzw. $\bar{y}$ stellen den zugehörigen Mittelwert der x - bzw. y -Werte dar und n entspricht wiederum dem Umfang der Stichproben (8).

2.3. T-Test

Unter folgenden Modellvoraussetzungen wurde die Testung auf Ablehnung der Hypothese $H_0: \mu_1 = \mu_2$ für μ_1 bzw. μ_2 als Mittelwerte der Stichproben 1 bzw. 2 durchgeführt: Die beiden Stichproben sind unabhängig voneinander und stammen beide aus einer normalverteilten Grundgesamtheit. Die Umfänge der Grundgesamtheit N_1 und N_2 sind so groß, daß die Korrekturfaktoren für endliche Gesamtheiten vernachlässigt

werden können. Es besteht Varianzhomogenität, d.h. es gilt:
 $\sigma_1^2 = \sigma_2^2 = \sigma^2$.

Es wurde auf einem Signifikanzniveau von $\alpha = 0,001$ mit der Prüfgröße T getestet. T ist t -verteilt mit $v = n_1 + n_2$ Freiheitsgraden, wobei n_1 bzw. n_2 den Umfang der 1. bzw. 2. Stichprobe darstellt. Die Hypothese H_0 muß abgelehnt werden, wenn die empirisch ermittelte Prüfgröße $T_{\text{emp.}}$ in den kritischen Bereich K fällt, der wie folgt definiert ist:

$$K = (-\infty ; -T_{\text{theor.}}) \cup (+T_{\text{theor.}} ; +\infty).$$

Dabei wurde der theoretische Wert der Prüfgröße $T_{\text{theor.}}$ nach der Formel aus den Tabellen für die STUDENT- t -Verteilung (2,21) entnommen und die Prüfgröße $T_{\text{emp.}}$ nach den Formeln D und E (siehe Kasten) berechnet.

Bezüglich der Anwendung weiterer statistischer Verfahren darf auf die angegebene Literatur verwiesen werden (8,21).

$$A: s^2 = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

$$B: a_0 = \bar{y} - a_1 \cdot \bar{x}$$

$$C: a_1 = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i y_i - \bar{x} \bar{y}}{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i^2 - \bar{x}^2}$$

$$D: T_{\text{emp.}} = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 \cdot n_2}}}$$

$$E: s = \sqrt{\frac{(n_1 - 1) \cdot s_1^2 + (n_2 - 1) \cdot s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

3. Tierhaltung

3.1. Mäuse

Maximal 5 gleichgeschlechtliche Balb/cMäuse wurden in Makrolon-Plastikkäfigen (Typ II, 400cm³) mit Sägemehlunterlage und Metallgitteraufsatz gehalten. Bei einer Temperatur von 20°C bis 22°, einer Luftfeuchtigkeit von 50% bis 70% und täglich 12 stündiger Beleuchtung erhielten die Tiere eine Alleinfutterdiät (Alma[®]-Pellets für Mäuse) ohne mengenmäßige Beschränkung und frisches Trinkwasser ohne Zusatz. Täglich wurden die Verhaltensweise, der Bewegungsablauf, das Haar-
kleid, der Ernährungszustand, die Freßlust, die Atmung und die Beschaffenheit von Harn und Kot kontrolliert. Die venöse Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene.

3.2. Kaninchen

Weißes Neuseelandkaninchen, welche mit einem Gewicht von 2,5 bis 5kg zur mittelgroßen Rasse gehören, wurden in Einzel-futterdrahtkäfigen (50cm x 50cm x 45cm) gehalten. Sie erhielten täglich portioniertes Standardfutter (Alma[®]-Pellets für Kaninchen) ohne andere Zugaben und frisches Trinkwasser. Die Temperatur wurde auf 20°C bis 21°C und die Luftfeuchtigkeit auf 50% bis 70% konstant gehalten. Die Tageslichtbeleuchtung war ganzjährig 12 Stunden/Tag eingeschaltet. Wie unter 2.1. angegeben wurden die Kaninchen täglich kontrolliert (37). Die venöse Blutentnahme erfolgte aus dem Ohr über eine heparinisierte Plastikverweilkanüle.

Anschriften

Prof.Dr.Dr.h.c.W.Brendel
Institut für chirurgische Forschung
Klinikum Großhadern
8000 München 70

Prof.Dr.B.U.v.Specht
Institut für chirurgische Forschung
Universität Freiburg
7800 Freiburg/Breisgau

Dr.W.Mraz
Klinisch-chemisches Institut
Klinikum Großhadern
8000 München 70

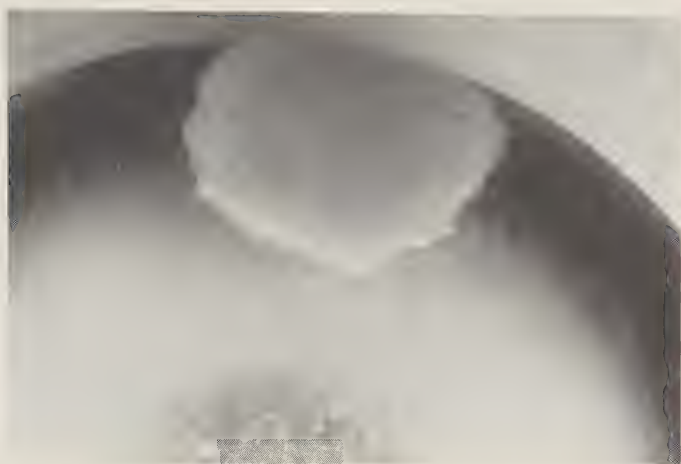
M.Marget
Abteilung für Molekularbiologie
Max Planck Institut für Biochemie
8032 Martinsried

R.M.Walter
Control Data Institut
Karlstr. 42/44
8000 München 2

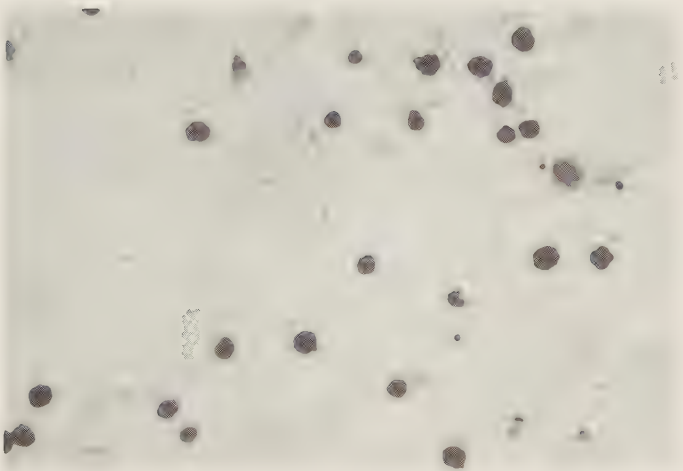
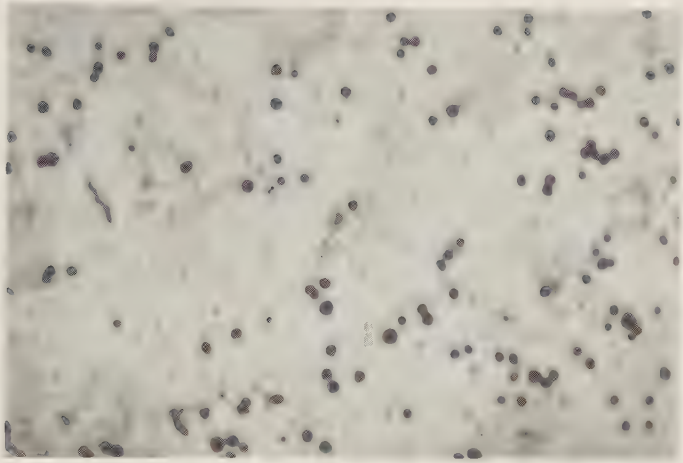
Dr.J.Rosenthaler
Pharmazeutisches Departement
Sandoz Ag
4002 Basel
Schweiz



Tafel 1



Tafel 2



Tafel 3

Lebenslauf

Name: Gabriele Christina Pflanz

Geburtsdatum, -ort: 22.03.1959, München

Eltern: Wolfgang W. Pflanz, Leiter einer EDV-Bildungsinstitution
Christine Pflanz, geb. Paucker, Rektorin

Schulische Bildung: 1966 - 1969 Grundschule in München
1969 - 1978 Gymnasium in München, (Abitur am humanistischen Zweig)

Medizinische Bildung: 1978 - 1985 Studium der Humanmedizin an der LMU München
1981 ärztliche Vorprüfung
1981 - 1983 zusätzliche, freiwillige Famulaturen in mehreren medizinischen Bereichen (10 Monate)
1984 - 1985 praktische Ausbildung, u.a. an der anästhesiologischen Abteilung der LMU München
1985 Abschluß der ärztlichen Prüfung und Approbation

Dissertation: ab 1983 Mitarbeit am Institut für chirurgische Forschung der LMU München

Medizinische Weiterbildung: ab 1986 Mitarbeit am Institut für Anästhesiologie der LMU München

Sonstiges: 1979 - 1984 Teilnehmerbetreuerin an einer Einrichtung für Erwachsenenbildung

